

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
30. November 2000 (30.11.2000)

PCT

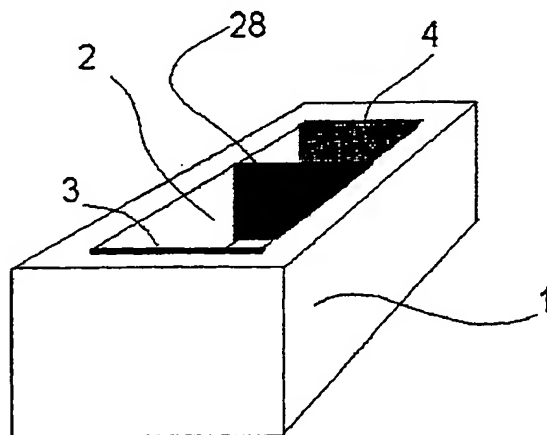
(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 00/71999 A1

- (51) Internationale Patentklassifikation⁷: G01N 27/447 (72) Erfinder; und
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BERGMANN, Clemens [DE/DE]; Mühlenstrasse 53, D-07745 Jena (DE). KAPLAN, Thomas [DE/DE]; Gutenbergstrasse 3, D-07407 Rudolstadt (DE). BIENHAUS, Gerhard [DE/DE]; Karwendelstrasse 1, D-82407 Wielenbach (DE). LANGE, Hans, R. [DE/DE]; Römerstrasse 99d, D-68623 Lampertheim (DE).
- (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP00/04560
- (22) Internationales Anmeldedatum:
19. Mai 2000 (19.05.2000)
- (25) Einreichungssprache: Deutsch
- (26) Veröffentlichungssprache: Deutsch (74) Anwälte: WEICKMANN, H., usw.; Kopernikusstrasse 9, D-81679 München (DE).
- (30) Angaben zur Priorität:
299 08 807.3 19. Mai 1999 (19.05.1999) DE (81) Bestimmungsstaaten (national): JP, US.
199 48 049.4 27. September 1999 (27.09.1999) DE
- (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): BILATEC GESELLSCHAFT ZUR ENTWICKLUNG BIOTECHNOLOGISCHER SYSTEME MBH [DE/DE]; Prof.-Hermann-Klare-Strasse 6, D-07407 Rudolstadt (DE). (84) Bestimmungsstaaten (regional): europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE).
- Veröffentlicht:
— Mit internationalem Recherchenbericht.

[Fortsetzung auf der nächsten Seite]

(54) Title: DEVICE AND METHOD FOR ISOLATING ELECTRICALLY CHARGED MOLECULES

(54) Bezeichnung: VORRICHTUNG UND VERFAHREN ZUR ISOLIERUNG VON ELEKTRISCH GELADENEN MOLEKÜLEN



(57) Abstract: The invention relates to a device which is open upward for electroelution of charged molecules in a reaction channel (2) comprising electrodes (3, 4) on the ends and at least one intermediate fitting (28). The device is particularly suitable for automating an xyz robot.

(57) Zusammenfassung: Es wird eine nach oben offene Vorrichtung zur Elektroelution von geladenen Molekülen in einem Reaktionskanal (2) mit Elektroden (3, 4) an den Enden und mindestens einem Zwischeneinbau (28) beschrieben. Die Vorrichtung ist insbesondere für die Automatisierung in einem x,y,z-Roboter ausgelegt.



WO 00/71999 A1

BEST AVAILABLE COPY

Doc Ref. AN1

Int'l. Appl. No. PCT/JP2003/015132



Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes, und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

Vorrichtung und Verfahren zur Isolierung von elektrisch geladenen Molekülen

Beschreibung

5

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und Vorrichtungen zur Isolierung von geladenen Molekülen mit einem breiten Anwendungsfeld zum Beispiel bei der Isolierung von elektrisch geladenen Molekülen in Rezeptor-Liganden-Gemischen oder bei der Probenvorbereitung von Nukleinsäuren.

10

Vor allem für letztere Anwendung können spezielle elektrophoretische Prozesse wie zum Beispiel die Elektroelution zur Anwendung kommen, wie sie in WO 97/34908 und WO 98/58251 beschrieben ist. Bei diesem Verfahren werden geladene Moleküle zunächst an einen Adsorber gebunden und dann in einem Elektroelutionsverfahren wieder freigesetzt, in ein Entnahmevolumen transferiert und dort auch konzentriert. Weitere Vorrichtungen zur Elektroelution sind z.B. in US 5340449 sowie US 4608147 beschrieben. Die dort beschriebenen Vorrichtungen sind jedoch nicht für Verfahren nach WO97/34908 ausgelegt oder vorgesehen, sondern umfassen geschlossene und verschraubte Kammersysteme. Diese werden dann in einem Elektrophoresepuffertank entsprechend verankert, wobei das Kammersystem hermetisch gegen den Elektrophoresepuffertank abgeriegelt ist. Ein wesentlicher Nachteil dieser Vorrichtungen besteht darin, daß sie für eine Automatisierung in einem Pipettierroboter nicht geeignet sind. Somit können sie nicht für Standardverfahren mit einem großen Probendurchsatz eingesetzt werden.

15

20

25

30

Bei der Entwicklung von nach oben offenen Elektroelutionsvorrichtungen muß der Tatsache Rechnung getragen werden, daß, je nach dem wie die Gestaltung im Detail aussieht, mit einem elektroosmotischen Fluß (EOF) gerechnet werden muß. Einzelheiten dazu sind z.B. in „Capillary Electrochromatography – Technology and Applications“ (CEC-Guidebook

Hewlett-Packard Publication Nr.: 5968-3231E) Kapitel 2 und „Analysis of Nucleic Acids by Capillary Electrophoresis“ (Chr. Heller (Ed.) ISBN 3-528-06871-X, 1997) Seite 24 ff beschrieben. Dieser Fluß, ausgelöst z.B. durch Kapillaröffnungen in dem Elektroelutionsbereich, kann das Elektroelutionsverfahren erheblich beeinflussen, ja sogar unmöglich machen.

Besonders schwerwiegend ist das Problem, daß bei herkömmlichen Vorrichtungen aufgrund des Auftretens eines elektroosmotischen Flusses eine der Kammern leerläuft, bevor die gewünschte Isolierung abgeschlossen werden kann. Um ein solches Leerlaufen einer der Kammern zu vermeiden, sind bisher komplizierte Maßnahmen, wie etwa ein Flüssigkeitsaustausch zwischen der Anoden- und der Kathodenkammer, zum Ausgleich des elektroosmotischen Flusses notwendig.

Eine Aufgabe der Erfindung bestand deshalb darin, eine Vorrichtung zur Isolierung von geladenen Molekülen bereitzustellen, welche automatisierbar ist und bei welcher die aufgrund des elektroosmotischen Flusses auftretenden Probleme des Standes der Technik zumindest teilweise beseitigt sind.

Diese Aufgabe wird erfindungsgemäß durch eine Vorrichtung und ein Verfahren gelöst, wie sie in den Ansprüchen beschrieben sind.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung zur Isolierung von elektrisch geladenen Molekülen besteht aus einem nach unten geschlossenen Grundkörper mit mindestens einem nach oben offenen Kanal und mindestens zwei Elektroden als rechten und linken äußeren Begrenzungen des Kanals, und ist dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den Elektroden im Kanal ein oder mehrere Zwischeneinbau(ten) angeordnet sind, die den Kanal in zwei oder mehr Kammern teilen.

- 3 -

Die Verwendung eines zumindest in den Probeeintrags- und Probeentnahmebereichen nach oben offenen Kanals ermöglicht die Verwendung der erfindungsgemäßen Vorrichtung in automatisierten Verfahren, beispielsweise mit Pipettierrobotern oder x,y,z-Robotern.

5 Weiterhin wird durch die Zwischeneinbauten der elektroosmotische Fluß verhindert bzw. reduziert. Die Zwischeneinbauten lassen insbesondere nur einen geringen elektroosmotischen Fluß zu, der für eine Aufkonzentrierung gewünscht ist, der aber nicht zum Leerlaufen einer Kammer führt, so daß eine Elektroelution von geladenen Molekülen möglich ist. Die

10 Zwischeneinbauten der erfindungsgemäßen Vorrichtung sind somit insbesondere für elektrisch geladene Moleküle durchlässig, stellen aber andererseits eine Flüssigkeitssperre dar, durch die der elektroosmotische Fluß begrenzt werden kann. Je nach Anwendung ist es dabei möglich, den elektroosmotischen Fluß vollständig zu verhindern oder aber einen geringen

15 osmotischen Fluß zuzulassen, der vorteilhafterweise zur Aufkonzentrierung eingesetzt werden kann. Bevorzugt wird durch die Zwischeneinbauten der erfindungsgemäßen Vorrichtungen der elektroosmotische Fluß derart begrenzt, daß das Volumen der Probeeintrags- bzw. Probeentnahmekammer innerhalb eines Zeitraums von maximal 60 Minuten, bevorzugt maximal 30

20 Minuten und besonders bevorzugt maximal 10 Minuten und mindestens 30 Sekunden, bevorzugt mindestens 1 Minute und mehr bevorzugt mindestens 2 Minuten einer Elektroelution nicht mehr als 90 Volumen-%, bevorzugt nicht mehr als 50 Volumen-% und besonders bevorzugt nicht mehr als 30 Volumen-% abnimmt. Es ist aber auch möglich, den elektroosmotischen

25 Fluß derart zu beschränken, daß das Kammervolumen in den angegebenen Zeitintervallen nicht mehr als 10 Volumen-%, bevorzugt nicht mehr als 5 Volumen-% abnimmt.

Während die erfindungsgemäße Vorrichtung bei beliebigen Spannungen

30 betrieben werden kann, werden bevorzugt Spannungen ≤ 250 V und insbesondere Spannungen < 42 V verwendet.

Die Größe der erfindungsgemäßen Vorrichtung kann je nach Anwendungszweck beliebig gewählt werden, beispielsweise im Produktionsmaßstab von einigen Litern oder größer bis hin zu miniaturisierten Vorrichtungen mit einigen Mikrolitern Kammervolumen, 5 beispielsweise zur Anwendung auf herkömmlichen Mikrotiterplatten, wie unten beschrieben. Bevorzugt beträgt das Volumen des nach oben offenen Kanals 0,01 bis 5 ml, mehr bevorzugt von 0,2 bis 2 ml.

Grundsätzlich können mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung alle elektrisch 10 geladenen Moleküle einschließlich deren übergeordneter Strukturen, wie etwa Komplexe, Cluster, spezifische Bindepaare usw. isoliert werden. Beispiele für bevorzugte elektrisch geladene Moleküle sind Biomoleküle, wie etwa Nukleinsäuren, insbesondere DNA, RNA, Proteine und andere Naturstoffe sowie Farbstoffe. So kann die Vorrichtung z.B. zur 15 Proteingemischanalyse und für Immunoassays eingesetzt werden. Ein besonders interessantes Anwendungsfeld ist die Verwendung der Vorrichtung zur Elution von Proteinen aus Gelen, beispielsweise aus zweidimensionalen Elektrophoresegelelen. Diese Technik wird insbesondere bei Proteomics zur Bestimmung der Proteinfunktionen der bei den 20 Genomprojekten (z.B. Hugo) aufgefundenen DNA-Sequenzen angewendet. Erfindungsgemäß kann aber auch die Nukleinsäure selbst isoliert werden.

Es wurde festgestellt, daß mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung Moleküle in einem großen Molekulargewichtsbereich von kleiner als 100 Da bis zu 25 mehr als einigen Millionen Da isoliert werden können. So wurde beobachtet, daß neben kleinen Molekülen, wie etwa Farbstoffmolekülen oder Polypeptiden, auch große Moleküle, wie etwa genomische Hefe-DNA, die Zwischeneinbauten durchdringen und somit isoliert bzw. gereinigt werden kann.

30

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform besteht mindestens eine der Zwischeneinbauten aus einem formstabilisierten Gel. Es wurde

überraschenderweise festgestellt, daß Gele, beispielsweise ein Agarose-Gel, in einer geringen Konzentration, beispielsweise von 0,1 % Gel bis 10 % Gel, bevorzugt 0,2 % Gel bis 1,2 % Gel, mehr bevorzugt bis 0,8 % Gel hervorragende Trenn- bzw. Filtereigenschaften aufweisen, wobei geladene
5 Teilchen durchgelassen werden, während der unerwünschte elektroosmotische Fluß auf ein Minimum begrenzt wird. Problematisch bei Gelen in solch geringer Konzentration ist aber, daß sie formstabil oder mechanisch sehr instabil sind und daraus keine Folien oder Filme hergestellt werden können, die als Trennelemente verwendet werden könnten. Es
10 wurde nun festgestellt, daß durch Formstabilisierung von solchen Gelen mechanisch stabile Elemente mit den oben genannten vorteilhaften Eigenschaften erhalten werden können. Die Erfindung betrifft deshalb auch solche formstabilisierten Gele sowie deren Verwendung als Zwischeneinbau in der oben beschriebenen Vorrichtung.

15 Bevorzugte Gele sind leicht deformierbare, an Flüssigkeiten bzw. Gasen reiche disperse Systeme aus mindestens zwei Komponenten, bestehend aus einem festen kolloid zerteilten Stoff mit langen oder/und stark verzweigten Teilchen und einer Flüssigkeit, insbesondere Wasser. Beispiele für geeignete
20 Gele sind Polysaccharid- und Proteingele, wie etwa Gelatine, Agar-Agar, Carrageen, Alginate, Alginsäure, Phyllophoran, Furcellaran, Agarose u.a., sowie Polymergele, wie etwa Polyacrylamidgele.

Erfindungsgemäß werden die stabilisierten Gele als Trennelemente, also z.B.
25 als Trennfilter oder Trennmembranen, eingesetzt und nicht als Trägermaterial. Sie werden bevorzugt als dünne Scheiben mit einer Dichte von mindestens 0,1 mm und bevorzugt 0,5 mm, und maximal 20 mm, bevorzugt maximal 5 mm und besonders bevorzugt maximal 2 mm eingesetzt. Die Moleküle durchwandern dabei die Gele quer, also durch die
30 dünnste Dimension.

- Die Formstabilität wird bevorzugt durch ein Stützelement erzielt, auf bzw. in das das Gel eingebracht wird. Besonders vorteilhaft hat sich die Verwendung von gesintertem Kunststoff, beispielsweise gesintertem Polypropylen oder Polyethylen mit einer Porenweite von 1 bis 200 μm , bevorzugt von 20 bis 120 μm verwiesen. Aber auch durch die Verwendung von Geweben, beispielsweise aus Kunststoffen wie etwa Polyester oder Polyamid, mit einer Maschenweite von 0,1 bis 500 μm , bevorzugt von 0,5 bis 10 μm als Stützelement lassen sich hervorragende Ergebnisse erzielen.
- 10 Durch den Vernetzungsgrad des Gels kann die Durchlässigkeit des formstabilisierten Gels eingestellt werden. Es ist dabei möglich, die Durchlässigkeit derart zu wählen, daß das gewünschte geladene Molekül bei den angelegten Spannungen durch das Gel durchtritt und dann aus der Probeentnahmekammer gewonnen werden kann. Für viele Anwendungen
- 15 kann es aber auch vorteilhaft sein, den Vernetzungsgrad so zu wählen, daß das geladene Molekül im Gel hängen bleibt und dann in weiteren Schritten aus dem formstabilisierten Gel wieder rückgewonnen wird. Ein Hängenbleiben des gewünschten Analyten im Gel kann auch durch geeignete Derivatisierung mit funktionellen Gruppen, die spezifisch (z.B.
- 20 Streptavidin bzw. Biotin) oder unspezifisch (z.B. hydrophile oder hydrophobe Gruppen) an den Analyten binden, erreicht werden.

Weiterhin ist es möglich, als Zwischeneinbau eine Flüssigkeitssperre zu verwenden, die sich öffnen und schließen läßt.

25

- In einer weiteren Ausführungsform wird als Zwischeneinbau ein Gewebe verwendet. Hierbei kann es bevorzugt sein, daß unter den Elektroelutionsbedingungen ein geringer elektroosmotischer Fluß von der Anode zur Kathode durch das Gewebe erzeugt wird. Um einen Durchtritt
- 30 von elektrisch geladenen Teilchen bei gleichzeitigem Vermeiden eines übermäßigen elektroosmotischen Flusses zu erzielen, weist das Gewebe bevorzugt eine Maschenweite von 0,1 bis 50 μm , bevorzugt von 0,5 bis 5

μm auf. Die Absorption von elektrisch geladenen Molekülen an das Gewebe ist bevorzugt kleiner als 40 %, besonders bevorzugt kleiner als 10 %, um einen Durchtritt des gewünschten Analyten in die Probeentnahmekammer zu ermöglichen. Besonders vorteilhafte Ergebnisse werden erhalten, wenn
5 das Gewebe durch Kalandrieren behandelt wurde.

Insbesondere bei einer Abtrennung von Analyten aus biologischen Proben von beispielsweise Zellresten wird die Maschenweite so abgestimmt, daß biologisch aktive Partikel definierter Größe nicht durch das Gewebe dringen
10 können.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung erlaubt eine flexible Handhabung und entsprechende Ausgestaltungen, je nach der beabsichtigten Anwendung. Beispielsweise können Mehrkammersysteme eingesetzt werden, falls der
15 gewünschte Analyt, beispielsweise eine Nukleinsäure oder ein Protein, nicht als erstes Molekül der Probemischung den Zwischeneinbau passiert. Dies kann beispielsweise bei der Verwendung von Detergentien zur Lyse von Zellen der Fall sein. Hier wird die Anordnung vorteilhafterweise so gewählt, daß die Detergentien, die als erstes durch den Zwischeneinbau gelangen,
20 durch den Probeentnahmeraum hindurch in eine weitere Kammer elektroeluiert werden.

Weiterhin ist es möglich, gewünschte Moleküle, die selbst unter den angelegten Bedingungen keine Ladung aufweisen, durch Träger mit
25 Ladungen zu versehen, beispielsweise durch die Verwendung von spezifischen geladenen Antikörpern oder Hybridisierungssonden. Weiterhin ist es möglich, die erfindungsgemäße Vorrichtung mehrdimensional zu gestalten, beispielsweise in Form eines Kreuzes, wodurch eine mehrdimensionale Auftrennung möglich wird.

30

Besonders bevorzugt ist eine Vorrichtung mit mindestens vier Kammern, wobei die Anoden- und Kathodenkammer, die benachbart zur Anode bzw.

Kathode liegen, im Vergleich zu den dazwischenliegenden Probeintrags- bzw. Probeentnahmekammern relativ groß sind. Bevorzugt weisen die Kathoden- und Anodenkammer ein Volumen von 5 bis 20 : 1 zum Volumen der Probeentnahme- bzw. Probeintragskammer auf. Auf diese Weise kann
5 das Probenvolumen gering gehalten werden, während auf der anderen Seite das Volumen an den Elektroden groß ist, so daß dort möglicherweise auftretende unerwünschte Nebenreaktionen weniger ins Gewicht fallen.

Eine Verringerung des Volumens der Probeentnahme- bzw. Probezugabekammer im Vergleich zur Anoden- bzw. Kathodenkammer kann
10 beispielsweise dadurch erzielt werden, daß der nach oben offene Kanal in der Mitte eine Verjüngung aufweist.

Zusätzlich zu den unterschiedlichen Volumina wird bevorzugt auch eine
15 unterschiedliche Pufferkonzentration in den einzelnen Kammern eingesetzt, wobei die Pufferkonzentration in der Anoden- bzw. Kathodenkammer bevorzugt 5 bis 20 : 1 zum Volumen der Probeintrags- bzw. Probeentnahmekammer beträgt. Neben der Pufferkonzentration kann auch der pH-Wert in den einzelnen Kammern unterschiedlich eingestellt werden.

20

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform, wie sie beispielsweise in Figur 26 dargestellt ist, besteht die Vorrichtung aus vier Kammern. Ausgehend von der Kathode auf der linken Seite ist zunächst eine Kathodenkammer, die relativ groß ist, beispielsweise ein Volumen von 1,6
25 ml aufweist und einen hochmolaren Puffer, beispielsweise in einer Konzentration von 100 mM, enthält. Diese Kammer wird durch eine Membran von der Probeintragskammer getrennt, welche ein geringeres Volumen, beispielsweise 160 µl, und eine geringere Pufferkonzentration, beispielsweise 10 mM, aufweist. Zwischen der Probeintrags- und der
30 Probeentnahmekammer befindet sich ein formstabilisiertes Gel, beispielsweise ein Agarosegeltrennfilter, der aus einem mit Agarosegel gefüllten gesinterten Kunststoff besteht. Die Probeentnahmekammer weist

wiederum ein geringes Volumen, beispielsweise 160 μ l, und eine geringe Pufferkonzentration, beispielsweise 10 mM auf. Als Trennung zwischen der Probeentnahmekammer und der Anodenkammer wirkt in dieser bevorzugten Ausführungsform ein weiterer stabilisierter Agarosegelfilter. Die

5 Anodenkammer selbst ist wieder relativ groß, beispielsweise 1,6 ml, und weist eine hohe Pufferkonzentration, beispielsweise 100 mM, auf. Ein Durchtreten des gewünschten Analyten bei einer Elektroelution durch den zweiten Gelfilter wird zum einen durch geeignetes Einstellen der Separationszeit und zum anderen durch Einstellung der

10 Pufferkonzentrationen in der Probeentnahmekammer und der Anodenkammer verhindert. Es wurde festgestellt, daß eine hohe Pufferkonzentration im Anoden- und Kathodenraum im Vergleich zum Probeentnahme- und Probeintragsraum einen zusätzlichen günstigen Einfluß auf die Trennleistung der Vorrichtung und auf eine Verringerung des

15 osmotischen Flusses hat. Die aus der Probeentnahmekammer entnommene Probe kann beispielsweise mittels Massenspektrometrie analysiert oder mittels PCR weiter verarbeitet werden.

Ein weiterer wesentlicher Vorteil der erfindungsgemäßen Vorrichtung

20 besteht darin, daß während der Transferschritte eine Prozessierung des Analyten erfolgen kann. Bevorzugt findet in den Kammern eine enzymatische Reaktion oder eine Rezeptor/Liganden-Bindung, insbesondere während des elektrophoretischen Transfers der geladenen Moleküle, statt.

25 Eine weitere Verbesserung der Trenneigenschaften kann durch reversibles Anlegen eines magnetischen Feldes in der Umgebung mindestens einer Elektrode erreicht werden.

Die Elektroden können aus leitfähigen Materialien, z.B. Metallen, und

30 bevorzugt aus leitfähigen Kunststoffen hergestellt sein. Die gesamte Vorrichtung kann auch aus einzelnen Modulen im Baukastensystem zusammengesetzt werden.

Die erfindungsgemäße Vorrichtung kann beispielsweise für das Separieren der freien von der gebundenen Phase bei Rezeptor-Liganden-Assays, zur Isolierung von Nukleinsäuren, zur Isolierung von DNA ohne Kontamination durch RNA oder zur Isolierung von RNA ohne Kontamination durch DNA
5 eingesetzt werden.

Die Erfindung betrifft weiterhin ein Verfahren zur Isolierung von elektrisch geladenen Molekülen, welches in einer wie oben beschriebenen Vorrichtung durchgeführt wird.

10

Weiterhin betrifft die Erfindung ein Verfahren zur Isolierung von geladenen Molekülen in Gemischen mit elektrophoretischen Mitteln in einem Reaktionskanal, welches dadurch gekennzeichnet ist, daß ein Gemisch in flüssiger Form in einen Reaktionskanal eingebracht wird, einer
15 Elektrophorese im Reaktionskanal unterworfen wird, bei dieser Elektrophorese im Reaktionskanal weiter prozessiert wird und nach dieser Prozessierung die isolierten geladenen Moleküle in löslicher Form aus dem Reaktionskanal entnommen werden.

20 Beim erfindungsgemäßen Verfahren wird das Ausgangsgemisch während der Elektrophorese weiter verarbeitet bzw. prozessiert, wodurch eine deutliche Vereinfachung des Gesamtverfahrens erzielt werden kann. Beispielsweise kann bei der Elektrophorese im Reaktionskanal eine Liganden-Rezeptor-Bindung, eine enzymatische Reaktion oder/und eine
25 Aufkonzentrierung stattfinden.

Durch Verwendung einer wie oben beschriebenen Vorrichtung, insbesondere einer Vorrichtung, in der ein oder mehrere formstabilisierte Gele bzw. andere der oben beschriebenen Einbauten dem Reaktionskanal in verschiedene
30 Kammern unterteilen, kann bei der Elektrophorese der elektroosmotische Fluß derart reduziert werden, daß eine Elektroelution von geladenen Molekülen möglich ist, ohne daß eine der Kammern leerläuft.

Besonders bevorzugt wird als Gemisch eine lysierte biologische Probe, beispielsweise lysierte Zellen eingesetzt. Weiterhin ist es möglich, die freie und die gebundene Phase von einem Liganden-Rezeptor-Assay, insbesondere von einem Immunoassay, zu trennen und dadurch eine
5 quantitative Bestimmung zu ermöglichen.

Weiterhin kann auch durch Abtrennen von Komponenten mit einer Markierung, beispielsweise einer radioaktiven Markierung, einer Enzymmarkierung, einer fluoreszierenden oder lumineszierenden Markierung
10 aus einem Gemisch eine quantitative Bestimmung durchgeführt werden.

Die Elektroelution wird insbesondere unter solchen Bedingungen ausgeführt, daß die Konzentration an Detergenz in der entnommenen Lösung mit den isolierten geladenen Molekülen kleiner ist als die Konzentration des
15 Detergenz in der ursprünglich in den Reaktionskanal eingebrachten Lösung einer lysierten Probe. Es kann auch vorteilhaft sein, zur Lysemischung vor der Elektroelution mindestens eine weitere Pufferkomponente zuzugeben.

Werden, wie hier beschrieben, Vorrichtungen eingesetzt, die nach oben
20 geöffnet sind, können mit Hilfe einer automatisierbaren Pipettiervorrichtung Probengemische, z.B. Nukleinsäuren bzw. Adsorber (z.B. in Partikelform), an die Nukleinsäuren gebunden sind, eingebracht werden. Solche Vorrichtungen sind generell für die Automatisierung mit der Verwendung von Pipettierrobotern (z.B. von der Firma TECAN, Rosys, Canberra Packard
25 und Beckman) geeignet.

Die erfindungsgemäßen Vorrichtungen ermöglichen einerseits eine Automatisierung mit nach oben offenen Vorrichtungen und tragen andererseits den Anforderungen des elektroosmotischen Flusses Rechnung.
30 Sie lassen sich überraschenderweise für Verfahren einsetzen, bei der Nukleinsäuren an Adsorber gebunden werden, die dann in eine Probeneintragskammer eingebracht und anschließend einer entsprechenden

Elektroelution mit Probenaufkonzentration unterworfen werden. Bei der Probenvorbereitung speziell von Nukleinsäuren aber auch von anderen geladenen Molekülen hat es sich gezeigt, daß es für eine möglichst einfache Handhabung - auch im Hinblick für eine Automatisierung - mit dem Transfer, also der räumlichen Veränderung der geladenen Moleküle noch ein weiterer Prozeßschritt verknüpft werden sollte. Dieser Prozeßschritt kann eine Veränderung der geladenen Moleküle selbst oder aber die Veränderung des Umfeldes der geladenen Moleküle bewirken. Ein solcher Prozeßschritt verknüpft mit dem Transfer bei der Elektroelution ist im Stand der Technik nicht vorgesehen.

Eine der wichtigsten Anwendungen der erfindungsgemäßen Vorrichtungen und Verfahren ist die Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischem Probenmaterial. Dazu ist zunächst eine Lyse des Probenmaterials notwendig, um die Nukleinsäuren aus den biologischen Kompartimenten, wie etwa Zellkern, Mitochondrien, Virushüllen etc. freizusetzen. Für diese Lyse wiederum erwies sich der Einsatz von hohen Konzentrationen an Detergentien jeglicher Art als hilfreich. Für die hier relevanten elektrophoretischen Prozesse eignen sich insbesondere ionisch aufgebaute Detergentien, insbesondere wiederum solche, mit negativ geladenen Detergensmolekülen, wie etwa Natriumdodecylsulfat.

Will man die freigesetzte Nukleinsäure der lysierten Probe weiter verarbeiten, z.B. in einer PCR nach US 4683195 oder einem Verdau mit Restriktionsenzymen, stören die hohen Detergenskonzentrationen und müssen entfernt werden. Diese Veränderung der Umgebung der geladenen Moleküle als neuer Prozeßschritt läßt sich erfindungsgemäß zusammen mit dem Transferschritt in entsprechenden Vorrichtungen und mit den erfindungsgemäßen Verfahren durchführen.

30

Eine weitere Anwendung gänzlich anderer Art leitet sich der molekularen Onkologie ab. Hier ist die Analyse von mRNA eines Onkogens z.B. ein

wichtiger diagnostischer Parameter. Dabei ist es entscheidend, daß die mRNA von der analogen genomischen DNA isoliert und getrennt wird, da Reste der genomischen DNA die anschließende RT-PCR stört und ihre Aussagekraft verfälscht. Für die Gewinnung der mRNA in einem

5 Probenvorbereitungsprozeß gibt es derzeit zwei Standardverfahren:

- a) die Hybridisierung der mRNA mit einem festphasengebundenen oligo(dT), der an die von Natur aus vorhandenen oligo(A)-Sequenz der mRNA bindet und anschließende Freisetzung nach einem Waschen, sowie
- 10 b) Verfahren, die durch selektive Fällung die mRNA isolieren.

Beide Verfahren weisen jedoch gravierende Nachteile auf. So neigt die mRNA bei a) dazu, zu zerbrechen, so daß man mit diesem Verfahren nur Teile der mRNA erfaßt, was für eine quantitative Analyse unmöglich macht.

15 Die Verfahren nach b) sind von der Handhabung aufwendig und lassen sich schwer automatisieren, da Zentrifugationsschritte notwendig sind.

Überraschenderweise wurde gefunden, daß durch Verknüpfung von Transfer und einem weiteren Prozeßschritt, nämlich des enzymatischen

20 DNA-Verdaus in diesem Falle, die Isolierung der mRNA ohne DNA-Verunreinigungen möglich ist.

Gegenstand der vorliegenden Anmeldungen sind daher auch Verfahren und Vorrichtungen zum Zwecke der Isolierung von geladenen Molekülen, die mit

25 dem elektrophoretischen Transfer eine weitere Prozessierung verknüpfen, wobei sich diese Prozessierung auf die Umgebung der geladenen Moleküle oder aber auf die Moleküle selbst beziehen kann.

Ein weiteres bevorzugtes Anwendungsfeld sind analytische Testverfahren,

30 die auf einer Liganden-Rezeptor-Wechselwirkung beruhen, insbesondere solche, die Antikörper-Antigen-Reaktionen nutzen. Solche Verfahren werden allgemein als Immunassays bezeichnet. Es gibt dabei zwei prinzipiell

unterschiedliche Anwendungen: homogene und heterogene Immunoassays. Bei den homogenen Immunoassays gelangen Verfahren zur Anwendung, bei denen alleine durch in Lösungbringen von Antikörper und Antigen in Form speziell markierter Derivate nach Inkubation ein Meßsignal erzeugt wird. Bei
5 den heterogenen Immunoassays muß nach Inkubation eine sogenannte bound/free-Trennung, also eine Trennung der während der Inkubation entstandenen Antikörper-Antigen-Komplexe von den nicht gebundenen freien Komponenten erfolgen. Eine zusammenfassende Darstellung dieser Techniken findet sich z.B. im „Handbook of Experimental Immunology“,
10 Weir, D.M. (Editor); Oxford; Blackwell Scientific und EP O 163 122, sowie den darin enthaltenen Zitaten zum Stand der Technik.

Der Verfahrensschritt der bound/free-Trennung stellt vor allem dann eine schwierige Aufgabe dar, wenn der Prozeß möglichst einfach automatisiert
15 werden soll. Dazu wurden in der Vergangenheit verschiedenste Verfahren wie z. B. Doppelantikörpertechniken, Techniken mit Festphasen-gebundenen Antikörpern, wie z.B. mit Mikro- und Makropartikeln, oder beschichteten Reaktionsgefäßen (coated tubes) beschrieben.

20 Überraschenderweise wurde nun festgestellt, daß die hier beschriebenen Vorrichtungen eine einfache Automatisierung der bound/free-Trennung von Liganden/Rezeptor-Assays ermöglichen. Im Gegensatz zu allen bisherigen Techniken, muß erfindungsgemäß nämlich kein Waschschrift in dem Sinne erfolgen, daß die Liganden-Rezeptor-Komplexe, die zunächst in einem ersten
25 Trennschritt separiert wurden, mit einer Waschlösung versetzt, suspendiert und erneut separiert werden müssen, um die an den Komplexen anhängende Reste von freien Komponenten ebenfalls zu entfernen. Dieser Waschschrift muß im Stand der Technik im allgemeinen sogar zweimal durchgeführt werden und stellt in den gängigen Immunoassays-Automaten wie z.B. ES
30 600 der Fa. Boehringer-Mannheim jetzt Roche Diagnostics oder dem Gerät Architect der Fa. Abbott z.B. gerade den Verfahrensschritt dar, der eine Limitierung des Durchsatzes bewirkt.

Die Vorrichtungen der vorliegenden Anmeldung ermöglichen einerseits eine Automatisierung, da sie nach oben offen sind und tragen andererseits den Anforderungen des elektroosmotischen Flusses Rechnung. Sie lassen sich überraschenderweise so einsetzen, daß die inkubierte Mischung eines

5 Liganden-Rezeptor-Gemisches in eine Probeneintragskammer eingebracht, anschließend einer entsprechenden Elektroelution unterworfen wird und eine direkte Auswertung ohne weitere Waschschrirte möglich ist.

Dabei kann eine Detektion je nach eingesetzten Liganden- bzw.

10 Rezeptormarkierungen durch Messung von Radioaktivität (beta- oder gamma-Strahlung), durch photometrische, fluorimetrische oder luminometrische Messungen, oder aber auch durch massenspektrometrische oder kernresonanzspektrometrische Verfahren erfolgen.

15 Gegenstand der vorliegenden Anmeldungen sind daher auch einfach automatisierbare Verfahren und Vorrichtungen zum Zwecke der Isolierung von geladenen Molekülen in Rezeptor-Liganden-Gemischen.

Figur 1a zeigt schematisch die perspektivische Ansicht einer erfinderischen

20 Vorrichtung. Es handelt sich dabei um einen Grundkörper (1), in den ein Reaktionskanal (2) eingearbeitet wurde. Der Reaktionskanal (2) zeichnet sich dadurch aus, daß er oben offen ist, einen entsprechenden Boden sowie Seitenwandungen enthält, so daß der Innenraum mit Elektrolytlösung gefüllt werden kann. Der Reaktionskanal (2) ist bevorzugt in einer rechteckigen

25 oder zylindrischen Form ausgeführt, bei der die kurzen Seiten jeweils mit Elektroden (3,4) an den äußeren Enden versehen werden. Zwischen diesen Elektroden (3,4) erstreckt sich der Reaktionskanal (2), der erfindungsgemäß mit mindestens einem Zwischeneinbau (28) versehen werden kann, so daß mindestens zwei Flüssigkeitskammern (z.B. 10, 7 in Fig. 2a) erzeugt werden

30 können. Der Kanal (2) hat typischerweise ein Volumen von 0,01 – 5 ml, bevorzugt von 0,2 – 2 ml. Der Grundkörper (1) besteht aus elektrisch nicht leitendem Material, in der Regel aus Kunststoffen wie Polyacetal,

- 16 -

Polycarbonat, Polyamid, Polystyrol, Polyethylen, Polypropylen, Polyacrylaten, Polyvinylchlorid oder ähnlichem und kann aus Halbzeug oder im Spritzguß- oder Blasenziehverfahren hergestellt werden. Im Einzelfall können auch glasfaserverstärkte Kunststoffe oder Kunststoffe mit anderen
5 Zuschlagstoffen Verwendung finden.

Fig. 1b zeigt eine erfinderische Variante der oben geschilderten Grundform des Kanals (2). Hier ist er in der Mitte eingeschnürt. Überraschenderweise wurde gefunden, daß mit dieser Formgebung eine besonders effiziente
10 Aufkonzentration von geladenen Molekülen erreicht werden kann. Diese Form trägt folgenden Phänomenen Rechnung, die bei der Elektroelution auftreten: a) Durch die elektrolytische Zersetzung an den Elektroden verändert sich der pH-Wert. Die Kammern um die Elektroden müssen deshalb ein ausreichendes Volumen aufweisen, um ausreichend
15 Pufferkapazität zur Verfügung zu stellen. b) Um eine ausreichende Aufkonzentration zu erreichen ist es jedoch erforderlich, ein möglichst kleines Probenentnahmenvolumen zu erhalten. Beides kann durch die Einschnürung (32) entsprechend erreicht werden, wenn sich der Probenentnahmeraum (7) an der Einschnürung (32) befindet. Die in Fig. 1b
20 gezeigte Ausführung ist bevorzugt als Spritzgußteil zum einmaligen Gebrauch bestimmt und weist Schlitze (12) im Grundkörper (1) für die Zwischeneinbauten, wie zum Beispiel die semipermeable Membran (14), auf, die im folgenden näher beschrieben sind. Erfindungsgemäß können auch mehrere Vorrichtungen in einem Verbund vorliegen, so zum Beispiel in
25 Streifenform oder als Platten, wobei das 96-Mikrotitrationsplattenformat, wie beschrieben in US 4 154 795 eine bevorzugte Lösung ist. Fig. 1h zeigt eine solche Ausführung mit Mikrotitrationsplattenstreifen (19) á 8 Kanäle (2) und einem passenden Mikrotitrationsplattenrahmen (18). In einer miniaturisierten Version können auch Formate mit 384 und 1536 Kanälen
30 zum Einsatz kommen.

Der Kanal (2) kann auch aus verschiedenen Einzelelementen Fig. 1 c-g zusammengesetzt und z B. mit einer Spannvorrichtung (23) in Fig. 1g zusammengehalten werden. Diese erfinderische Ausführung besteht aus einzelnen Grundelementen (Fig. 1c – 1f), die mittels Dichtelemente (25) an
5 Paßflächen (20) aneinandergereiht und dann mit einer oder mehrerer Spannvorrichtungen (23) zusammen gepreßt werden. Die Grundelemente sind in der Regel nach oben offen und U-förmig. Es können jedoch auch einzelne nach oben geschlossene Elemente verwendet werden, wie z.B. eine vorgefüllte geschlossene Kathoden- oder/und Anodenkammer.

10

Fig. 1c zeigt den nach unten geschlossenen Grundkörper (1) mit einer entsprechenden Aussparung (2), die dann den Reaktionskanal (2) bilden, wenn mehrere Grundelemente verbunden mit Dichtelementen (25) an der entsprechenden Paßfläche (20) mittels Spannvorrichtung (23)
15 zusammengepreßt werden.

Fig. 1d zeigt eine Ausführung eines Zwischeneinbaus (28) für den Reaktionskanal (2). Sie besteht aus einem Rahmen (29) mit einem rechteckigen oder runden Fenster, in das Materialien für die
20 Zwischeneinbauten (28) eingebracht werden können. In einer bevorzugten Ausführung ist dieses Element in einem schichtweisen Aufbau gefertigt, mit Laminierfolien (29) außen und den entsprechenden Zwischeneinbaumaterialien (28) in der Mitte. Das Element wird dann mit Hilfe eines Laminiergerätes verschweißt und weist dadurch eine glatte
25 Paßfläche (20) und somit auch eine gute Dichtigkeit auf.

Fig. 1e stellt ein entsprechendes Dichtelement (25) dar mit den beidseitigen Paßflächen (20). Diese Dichtungselement ist erfindungsgemäß bevorzugt aus Silikon oder aus Teflon, je nach Einsatz der Reaktanten.

30

Fig. 1f stellt eine Ausführung für Elektroden dar, die als Plattenelektrode oder aber in schichtweisem Aufbau wie Fig. 1d aufgebaut ist. Dabei ist eine

elektrische Zuleitung (30) für die im Fenster befindlichen Elektroden (3,4) vorgesehen.

Fig. 1g zeigt in der Aufsicht einen aus Grundelementen zusammengesetzten Reaktionskanal mit verschiedenen Zwischeneinbauten. Es erwies sich als vorteilhaft die Grundelemente in einer Aufnahme (26) einzubringen, an der eine entsprechende Spannvorrichtung (23) angebracht ist. Anstelle der Aufnahme (26) mit Spannvorrichtung (23) können auch erfinderische Elemente wie Fig. 1i und 1j zum Einsatz gelangen, die über einen entsprechenden Klemmkonus (9) mit oder ohne Rastnasen (16) zusammengesteckt werden können und auch ohne Spannvorrichtung (23) flüssigkeitsdicht zusammenhalten.

In Fig. 1i ist das Grundelement zur Begrenzung des Kanals dargestellt, der in diesem Falle durch Zusammenstecken mit dem Grundelement zur Verlängerung aus Fig. 1j in beliebiger Länge erzeugt werden kann. Auf der entgegengesetzten Seite erfolgt dann eine Begrenzung mit einem identischen Grundelement wie Fig. 1i. Dieses hat entweder wie in Fig. 1i dargestellt entsprechende Schlitze zur Aufnahme von Elektroden (3). Erfindungsgemäß haben sich jedoch zwei davon abweichende Varianten als vorteilhaft erwiesen: Bei Variante A wird dabei in einem Zweikomponentenspritzgußprozeß eine Elektrode aus leitfähigem Kunststoff beim Produktionsprozeß direkt eingespritzt. Überraschenderweise läßt sich in Variante B auch das gesamte Grundelement aus leitfähigem Kunststoff herstellen. Dies stellt eine besonders kostengünstige Variante dar. Als Blendzuschlagsstoffe für Polypropylen haben sich als besonders vorteilhaft dafür Materialien mit Widerständen kleiner 1000 Ohm wie zum Beispiel Cabelec 3827 und Pre-Elec 1362 erwiesen. Das Verlängerungselement nach Fig. 1j muß entsprechend aus nichtleitendem Kunststoffen, bevorzugt Polypropylen hergestellt werden.

In Fig. 1j ist eine weitere erfinderische Variante dargestellt, da hier eine Öffnung (31) einen Zugang zum Reaktionskanal (2) ermöglicht. Diese Öffnung (31) kann auch zum Absaugen von Lösungen, z.B. bei Waschvorgängen, benutzt werden.

5

Mehrere solcher Reaktionskanäle können über integrierte Verbindungselemente (21) wie zuvor geschildert zu einem Verbund, bevorzugt im das 96-Mikrotitrationsplattenformat zusammengesteckt werden. Eine Integration in einen entsprechenden Rahmen ist ebenfalls

10

einfach zu erreichen.

Der Reaktionskanal kann auch eine Verzweigung beinhalten, so daß beispielsweise eine mehrdimensionale Isolierung durchgeführt werden kann.

15

Im Folgenden werden die verschiedensten Zwischeneinbauten (28) im Kanal (2) näher beschrieben werden, die verschiedenste Funktionen erfüllen, wobei ein Zwischeneinbau (28) den Reaktionskanal (2) in einen Probeneintragsraum (10) und in einen Probenentnahmeraum (7) teilt, wie in Fig.2 dargestellt (Fig. 2 a: Aufsicht, Fig. 2b: Schnittdarstellung)

20

In einer erfindungsgemäße Vorrichtung muß ein Zwischeneinbau (28) folgende Kriterien erfüllen, um, z.B. für eine Elektroelution, geeignet zu sein. Der Zwischeneinbau muß

25

- a) eine elektrische Leitfähigkeit vermitteln,
- b) eine Durchlässigkeit für geladenen Moleküle ermöglichen
- c) eine Flüssigkeitssperre darstellen, so daß die beiden Räume (10, 7) keinerlei Flüssigkeitsaustausch besitzen, wenn keine Spannung an den Elektroden anliegt,
- d) gegebenenfalls Partikel zurückzuhalten und
- e) ggfs. einen elektroosmotischen Fluß zur Aufkonzentrierung erzeugen, aber den elektroosmotischen Fluß derart begrenzen, daß eine Elektroelution durchgeführt werden kann.

30

Überraschenderweise wurde gefunden, das eine erfinderische Vorrichtung wie Fig. 3 z.B. diese Kriterien erfüllt. Dabei ist eine semipermeable Membran (14) in der Nähe der Anode (4) angebracht, so daß ein Anodenraum (8) zwischen der Membran (14) und der Anode (4) entsteht. Darüber hinaus ist

5 ein weiteres Element, nämlich ein Gewebe (5) oder, wie unten beschrieben, ein formstabilisiertes Gel zwischen der semipermeablen Membran (14) und der Kathode (3) eingebracht. Hierbei handelt es sich bevorzugt um ein Präzisions-Siebgewebe mit einer definierten Maschenweite und mit einer definierten offenen Siebfläche, wie beschrieben in „Synthetische

10 Monofilament Präzisions-Siebgewebe (Firmenbroschüre Fa. Sefar, Rüslikon, Schweiz). Bei diesem Gewebe (5) kann es sich z.B. um Nylon- und/oder Polyestergewebe handeln. Diese Gewebe (5) können auch entsprechend kalandriert oder ähnlich behandelt sein. Die Erfüllung der zuvor geschilderten Anforderungen wurde bei solchen Geweben nur in

15 einem bestimmten Bereich für die Maschenweite und für die offene Siebfläche festgestellt. Die Maschenweite beträgt dabei 0,1 - 500 μm , bevorzugt jedoch 0,5 - 10 μm , die offene Siebfläche 0,2 % - 40 %, bevorzugt jedoch 0,5 - 2 %. Die Art des Materials spielt dabei ebenfalls ein große Rolle. Wie in Beispiel 1 gezeigt, wird an dem Gewebe (5) ein

20 elektroosmotischer Fluß erzeugt, der das Volumen des Probenentnahmeraums (7) verringert. Es können bei diesem Gewebe (5) auch andere Arten von Geweben, wie z.B. Wolle, Baumwolle zum Einsatz gelangen. Ein solches Gewebe (5) läßt sich in einem Zwischeneinbau (28) in einer Vorrichtung nach Fig. 3 zur Durchführung einer Elektroelution

25 dahingehend verwenden, daß in den Probeneintragsraum, der hier dem Kathodenraum (6) entspricht, z.B. Partikel eingebracht werden, die als Adsorber mit elektrisch geladenen Molekülen, insbesondere Nukleinsäuren, beladen sind (Fig. 9c und Beispiel 4). Nach Befüllung des Probenentnahmeraums (7) sowie des Anodenraums (8) mit einer

30 entsprechenden Elektrolytflüssigkeit läßt sich dann durch Anlegen einer Spannung zwischen den Elektroden (3,4) eine Trennung der geladenen Moleküle von dem Adsorber erreichen. Das Gewebe (5) behindert dabei die

elektrische Leitfähigkeit nicht und läßt geladene Moleküle, insbesondere Nukleinsäuren, passieren. Außerdem erfüllt es die Aufgabe, die Partikel im Probeneintragsraum (10) zurückzuhalten, so daß aus dem Probenentnahmeraum (7) eine entsprechend klare Nukleinsäurelösung entnommen werden kann. Darüber hinaus wird durch das Gewebe gewährleistet, daß bei der Entnahme der Nukleinsäure mit einer Pipette nur im begrenzten Umfange Elektrolytlösung aus der Probeneintragskammer (10 hier identisch 6) nachfließt und die isolierte Nukleinsäure verunreinigt. Weiterhin hat die Ausführung nach Fig. 3 eine semipermeable Membran (14), die geladenen Moleküle ab einem gewissen Molekulargewicht daran hindert in den Anodenraum (8) zu wandern. Dieser Zwischeneinbau hat also eine Schutzfunktion und verhindert das Vordringen der geladenen Moleküle in den Anodenraum und eine oxidative Zerstörung dieser an der Elektrodenoberfläche.

Überraschenderweise wurde festgestellt, daß in Folge des zuvor erwähnten elektroosmotischen Flusses das Puffervolumen in der Probenentnahmekammer (7) bei richtiger Auswahl der Gewebe (5) reduziert wird und auf diese Art und Weise eine Aufkonzentration der geladenen Moleküle stattfindet. Dies ist vor allem bei der Nukleinsäureanalytik ein entscheidender Vorteil. Bei der Anwendung einer Vorrichtung nach Fig. 3 mit Partikeln, die in den Kathodenraum (6), der dem Probeneintragsraum (10) entspricht, eingebracht werden, ist ein weiterer erfinderischer Vorteil, daß die Partikel bei geeignetem Gewebe im Probeneintragsraum (10 identisch 6) zurückgehalten werden, so daß aus dem Probenentnahmeraum (7) eine entsprechend klare Nukleinsäurelösung entnommen werden kann. Es muß dabei Sorge getragen werden, daß die Ausschlußgröße der Gewebemaschenweite dem der verwendeten Partikel entsprechend angepaßt werden muß.

Es kann in einer weiteren Variante auch eine Flüssigkeitssperre (13) eingesetzt werden, die durch entsprechende Führungen (12) in den

Grundkörper (1) flüssigkeitsdicht und beweglich eingebracht werden kann, wie Figur 4 bzw. 5a und 5b zeigen. Figur 5a zeigt die Flüssigkeitssperre (13) im offenen Zustand, während Figur 5b den geschlossenen Zustand zeigt, bei dem durch Eindrücken der Flüssigkeitssperre (13) in den Grundkörper (1) der Reaktionskanal (2) geschlossen wird.

Figur 6 verdeutlicht nun den Anwendungsbereich einer solchen Flüssigkeitssperre (13). Die entsprechende Vorrichtung sieht neben den Elektroden (3,4) und der semipermeablen Membran (14) ein entsprechendes Gewebe (5) und/oder eine Fritte (27) vor. Letztere bilden in Richtung der Kathode (3) einen Probeneintragsraum (10), in den Partikel nach Beispiel 4 eingebracht werden können. Nach erfolgter Elektroelution sammeln sich die geladenen Moleküle im Probenentnahmeraum (7) an, da die Flüssigkeitssperre (13) zunächst geöffnet ist. Durch Eindrücken der Flüssigkeitssperre (13) entsteht nun ein gegen den Raum (6) flüssigkeitsdicht geschlossener Probenentnahmeraum (7), aus dem mit Hilfe von Pipetten z.B. die geladenen Moleküle, wie etwa Nukleinsäure, entnommen werden können.

Fig. 8 zeigt eine spezielle erfinderische Vorrichtung für den Einsatz von Adsorbentien mit magnetischen Eigenschaften. Solche können mittels Dauermagneten (17) an bestimmten Stellen des Reaktionskanals (2) zurückgehalten werden. Dazu muß eine Dauermagnet (17) in die Nähe des Reaktionskanals gebracht werden. Für die Elektroelution bietet sich daher insbesondere an, einen geeigneten Dauermagneten in die Nähe des Probeneintragsraumes (10) zu bringen, so daß die Partikel nach Abgabe der geladenen Moleküle z.B. auf den Boden oder an die Seitenwandung gezogen werden können. Durch diese Maßnahme kann die anschließende Elektroelution nicht dadurch beeinträchtigt werden, daß sie Gewebe oder andere Einbauten im Reagenzkanal durch Partikel verstopft werden.

Neben der Elektroelution (Beispiel 4) können erfindungsgemäße Vorrichtungen auch zur Rückgewinnung von Nukleinsäure aus Gelen (Agarose oder Polyacrylamid) eingesetzt werden (Beispiel 2).

- 5 Scheiben oder Blöcke aus herkömmlichen Agarose- oder Polyacrylamidgelen stellen besonders geeignete Zwischeneinbauten dar, wobei für Vorrichtungen zur Nukleinsäureisolierung z.B. gefunden wurde, daß besonders Gele mit niedrigem Vernetzungsgrad, also kleinen Anteilen an Gelfüllstoff von besonderem Vorteil sind. Wiederum zeigte sich, daß die
- 10 Dicke der Zwischeneinbauten entsprechend dünn sein sollten. Sie betragen insbesondere 0,1 – 20 mm, bevorzugt 0,5 – 5 mm. Die Anteile an Gelfüllstoff in erfindungsgemäßen formstabilisierten Gelen wie z.B. Agarose beträgt 0,1 – 10 %, bevorzugt 0,12 – 4 %. Versuche, solche dünnen Gelscheiben auf herkömmliche Weise herzustellen, scheitern wegen der
- 15 mangelnden Formstabilität. Überraschenderweise wurde nun festgestellt, daß diese Gele auf verschiedenste Arten formstabilisiert werden können, so daß sie danach in eine erfinderische Vorrichtung eingebracht werden können.
- 20 Die Formstabilisierung erfolgt insbesondere durch Einbringen von Stützelementen, wobei im Folgenden zwei erfinderische Varianten beschrieben werden. Bei Variante A wird der Zwischenraum zwischen zwei Geweben (5) mit der warmen, flüssigen Gelmasse ausgegossen. Nach Erkalten wird die Gelmasse fest und ist durch die Gewebe entsprechend
- 25 formstabilisiert, so daß auch Gelschichten mit niedrigen Agarosekonzentrationen eingesetzt werden können. Beispiele 5 und 7 schildern die Herstellung im Einzelnen. Fig. 7b zeigt diesen schichtartigen Stabilisierungsaufbau mit den zwei Geweben (5) und der dazwischenliegenden Gelschicht (34). Dieser Gesamtaufbau wird im
- 30 Folgenden als formstabilisiertes Gel (33) bezeichnet.

Eine weitere erfinderische Variante B (Beispiel 7) ist der Einsatz eines gesinterten Kunststoffs als Stützelement, das mit zunächst noch flüssigen Gel so getränkt ist, daß nach Festwerden des Gels seine Poren mit Gel ausgefüllt sind. Solche gesinterten Kunststoffe sind aus Polyethylen, Polypropylen oder ähnlichem Material und werden durch einen Sinterprozeß aufgeschäumt, so daß verschiedenste Kapillarstrukturen entstehen. Die Kapillaren sind von ihren Abmaßen insbesondere 1 – 200 μm , bevorzugt 20 – 120 μm . Solche formstabilisierten Gele erfüllen zum einen den Zweck, daß sie für geladene Moleküle, insbesondere Biomoleküle in gewissen Molekulargewichtsbereichen durchlässig sind, daß sie zum anderen aber Flüssigkeitssperren darstellen. Beispiel 7 schildert weitere Details der Herstellung dieser Variante B.

Eine breite Anwendung solcher formstabilisierten Gelen ist bei verschiedensten Blotting-techniken gegeben. Hier kann es bei Verwendung von Gelen nach dem Stand der Technik ohne Formstabilisierung zu einem Zerreißen infolge unsachgemäßer Handhabung kommen, da gerade für diese Techniken Gele manuell mehrmals transferiert werden müssen. Durch Anwendung der erfindungsgemäße Formstabilisierung ergibt sich hier ein großer Vorteil hinsichtlich einfacher und sicherer Handhabung beim Umbetten der Gele, da ein Schutz hinsichtlich Zerstörung des Gelkörpers gegeben ist.

Bei der Verwendung von hier geschilderten nach oben offenen Vorrichtungen muß der Tatsache Rechnung getragen werden, daß je nachdem, wie die Gestaltung im Detail aussieht, mit einem elektroosmotischen Fluß (EOF) gerechnet werden muß. Dieser Fluß, ausgelöst z.B. durch Kapillaröffnungen in dem Elektroelutionsbereich, kann das Elektroelutionsverfahren erheblich beeinflussen, ja sogar unmöglich machen. Insbesondere bedingt ein Leerlaufen einzelner Kammern bei herkömmlichen Systemen, also der Transfer nahezu des gesamten Flüssigkeitsvolumens von einer Kammer in eine andere aufgrund von

Elektroosmose einen Abbruch des Elutionsverfahrens. Wird der EOF so eingesetzt, daß er einerseits zu einer moderaten Reduktion des Volumens des Probeentnahmeraumes führt, andererseits aber die Wanderung der geladenen Moleküle nicht zu stark behindert, kann eine Aufkonzentration dieser erreicht werden, was für den gesamten Prozeß von Vorteil ist. Überraschenderweise wurde gefunden, daß dies mit formstabilisierten Gelen erreicht werden kann, wozu weitere Details in den Beispielen beschrieben sind.

10 Eine weitere Problematik ist die Anwendung einer geeigneten Stromspannung für die erfinderischen Transferprozesse. Hier ist es aus sicherheitstechnischen Erwägungen sinnvoll, im sogenannten Niederspannungsbereich unter 42 V Gleichspannung zu bleiben, da dann keine Abdeckungen des stromführenden Reagenzkanals notwendig ist. Die erleichtert vor allem eine Automatisierung. Überraschenderweise wurde
15 gefunden, daß dies durch Einsatz eines Puffer mit höherer Ionenleitfähigkeit im Anoden und Kathodenraum erzielt werden kann. Der Puffer kann dabei 2 – 30 fach, bevorzugt jedoch 5 – 15fach konzentrierter sein als in den innenliegenden Kammern. Ein formstabilisiertes Gel zwischen
20 Probenentnahmeraum (10) und einer benachbarten Anodenkammer (8), die mit einer wie zuvor geschildert höheren Pufferkonzentration befüllt wird, wirkt erfindungsgemäß wie eine semipermeable Membran und schützt die geladenen Moleküle davor, an die Anode (4) zu gelangen und ggf. zersetzt zu werden. Als erfinderischer Vorteil ist das formstabilisierte Gel besser
25 durchlässig für Detergentien.

Zur Lösung spezieller Aufkonzentration- und Fokussierungsfragestellungen können auch erfindungsgemäß Puffergradienten zwischen den Elektrodenkammern zu den Kammern im Innenraum zum Einsatz gelangen, wobei die stärker konzentrierten Puffer jeweils an den Elektroden eingesetzt
30 werden. Auch haben sich Mehrpuffersysteme als erfinderisch erwiesen, bei denen benachbarte Kammern mit unterschiedlichen Puffersubstanzen und

unterschiedlichen pH-Werten zum Einsatz gelangen. Dieser Vorteil kann auch durch Mischung von unterschiedlichen Puffern beim Probeneintrag genutzt werden. Die Verwendung von formstabilisierten Gelschichten in einem erfindungsgemäßen Reaktionskanal unter Berücksichtigung der zuvor

5 geschilderten Randbedingungen ermöglichen eine Vielfalt von Anwendungen, bei denen geladene Moleküle transferiert und gleichzeitig die Umgebung prozessiert werden kann, wie im Folgenden näher beschrieben wird.

10 Eine Vorrichtung nach Fig. 7a mit einem Gewebe (5), einer formstabilisierten Gelschicht (33) und einer semipermeablen Membran (14) als Flüssigkeitssperren kann wie folgt zur Isolierung von z.B. Nukleinsäuren benutzt werden. In den Probeneintragsraum (10) wird Nukleinsäure

15 eingebracht, die Vorrichtung wird mit Elektrolyt oder Elektrophoresepuffer soweit befüllt, daß die Zwischeneinbauten noch herausragen und an die Elektroden wird eine Gleichspannung angelegt. Die Nukleinsäure wandert durch das formstabilisierte Gel (33) und reichert sich vor der semipermeablen Membran (14) im Probenentnahmeraum (7) an. Durch den elektroosmotischen Fluß vermindert sich der Flüssigkeitspegel in Kammer

20 (7) und die Nukleinsäure wird in konzentrierter Form entnommen. Je nach Anteile an Gelfüllstoff im formstabilisierten Gel kann auch eine Selektionierung der Nukleinsäuren nach Molekulargewicht vorgenommen werden.

25 Zur Isolierung von Nukleinsäuren aus biologischen Proben eignet sich u.a. Fig. 7f. Hier schließt eine semipermeable Membran (14) den Kathodenraum (6) ab und stellt die Verbindung zum Probeneintragsraum (10) dar. Zur Anode hin befinden sich zwei formstabilisierte Gele (33) und (33a), die den Probenentnahmeraum (7) und den Anodenraum (8) begrenzen. Eine aus

30 einer biologischen Probe gewonnenen Lysemischung mit freigesetzten Nukleinsäuren wird in die Probeneintragskammer (10) eingebracht. Die Lysemischung enthält zur Freisetzung der Nukleinsäuren und Zerstörung der

biologischen Strukturen Detergentien wie Lithium-, Natriumdodecylsulfat, Cetylammmoniumbromid, ionische Tenside oder ionische Glykoside o.ä.. Diese werden in Konzentrationen von 0,1 – 10 %, bevorzugt jedoch 0,1 – 2 % eingesetzt. Es können aber auch chaotrope Salze wie

5 Guanidiniumthiocynat, Guanidiniumhydrochlorid, Jodsalze, Perchlorate o.ä. zum Einsatz gelangen. Die Vorrichtung wird mit Elektrolytlösung befüllt und eine Spannung wird angelegt. Das formstabilisierte Gel (33) hat einen geringen Anteil an Gelfüllstoff, der 0,12 % - 0,2 % beträgt und hält nicht nur größere Zelltrümmer sondern auch größere Proteinaggregate zurück. Die

10 freigesetzten Nukleinsäuren und das Detergens, z.B. Natriumdodecylsulfat passiert diesen Zwischeneinbau, wobei das Detergens infolge seines kleineren Molekulargewichtes über die Kammer (7) schneller in die Anodenkammer (8) durchläuft, als die Nukleinsäure. Das formstabilisierte Gel (33a) trennt somit die Nukleinsäuren vom Detergens. Die Nukleinsäuren

15 werden von diesem formstabilisierten Gel (33a) zurückgehalten und aus der Kammer (7) entnommen. Eine semipermeable Membran muß in diesem Falle entfallen: Einerseits reicht der Schutz durch das formstabilisierte Gel (33a) aus, andererseits wurde überraschenderweise festgestellt, daß Detergentien wie SDS formstabilisierte Gele generell leicht passieren,

20 während vermutlich infolge von Mycelbildung semipermeable Membranen als Zwischeneinbauten das Detergens zurückhalten. Der elektrophoretische Prozeß dauert 1 - 30 min, bevorzugt jedoch 2 - 12 min und läßt sich dadurch sehr einfach automatisieren, daß die erfindungsgemäße Vorrichtung zusammen mit einer geeigneten Stromversorgungseinheit auf einen

25 Pipettierroboter gestellt wird. Die Flüssigkeiten können dann automatisch pipettiert werden, und für den Isolierungsprozeß wird ein elektrisches Signal vom Pipettierroboter geliefert, um die Stromversorgungseinheit ein- und auszuschalten. Anschließend kann die isolierte Nukleinsäure mit dem Roboter entnommen und für die weitere Verarbeitung verwendet werden.

30

Reicht die direkte Abreicherung des Detergens aus der Lysemischung nicht aus, so kann in einer Vorrichtung nach Fig. 7d mit zwei formstabilisierten

Gelschichten (33) und (33a) als Flüssigkeitssperren ein abgewandelter Prozeß zur Isolierung von Nukleinsäuren wie folgt benutzt werden. In diesem Falle werden in den Kathodenraum (6) Partikel, bevorzugt solche, die magnetische Eigenschaften besitzen, eingebracht, die mit Nukleinsäure zuvor beladen und ggf. auch mit Waschlösungen behandelt wurden. Das erste Gewebe (5) ist so ausgelegt, daß es die Partikel zurückhält. Nach Befüllung mit Elektrolyt und Anlegen einer Spannung an die Elektroden (3,4) wandern geladene Biomoleküle durch das Gewebe in die Kammer (35) und durch das formstabilisierte Gel (33) wie zuvor, werden dann aber durch das formstabilisierte Gel (33a) zurückgehalten, während Detergensreste die z.B. an den Partikel adsorbiert sind diese passieren. Die detergensfreie Nukleinsäure wird aus dem Probenentnahmeraum (7) entnommen. Zur Entfernung größerer Detergismengen, bei Natriumdodecylsulfat z.B. größer als 2 % können erfindungsgemäß auch spezielle Kammern eingesetzt werden, die detergensbindende Mittel beinhalten oder Mittel, die Detergens ausfällen. Es ist auch möglich, detergensbindende Mittel nach der Lyse zuzugeben und durch die Elektroelution dann abzutrennen. Als detergensbindende Mittel können bevorzugt hydrophobe makroporöse Partikel mit großer innerer Oberfläche wie z B. Detergenz Adsorber-Gel [Fa. Roche Diagnostics, Mannheim Kat. Nr.: 1 500 678] verwendet werden. Außerdem können zuvor genannte Materialien auch in gesinterter Form als Zwischeneinbau (28) zum Einsatz kommen, um Detergentien zu binden.

Je nach Konzentration der Agarose in Agarosegelen bzw. des Polyacrylamids in Polyacrylamidgelen können die Kapillarstrukturen der Gele verändert werden und diese Materialien werden im Elektrophoreseprozeß als Molekularsiebe eingesetzt („Electrophoresis Theorie, Technics and Biochemical and Clinical Applications“ A. T. Andrews (Ed.) ISBN 0-19-854633-5, Clarendon Press, Oxford 1988). Dazu werden jedoch entsprechend große Wanderungsstrecken (2 – 80 cm) benötigt. Überraschenderweise wurde jedoch gefunden, daß mit der Vorrichtung gemäß Fig. 7 auch in dünnen formstabilisierten Gelschichten von 0,1 – 20

mm, bevorzugt jedoch 0,5 – 5 mm eine Trennung von geladenen Molekülen stattfinden kann, so daß neben der oben geschilderten Flüssigkeitssperre auch die Funktion als Molekularsiebe für die Isolierung von geladenen Molekülen eingesetzt werden kann.

5

Darüber hinaus kann die formstabilisierte Gelschicht auch als Schutz der Anode eingesetzt werden und die semipermeable Membran (14) ersetzen. Im Falle des Einsatzes von Agarose sollte die Agarose-Konzentration dafür 2 – 5 %, bevorzugt 2,5 – 3,5 % sein.

10

Eine weitere Anwendung ist die Isolierung von Ribonukleinsäure (RNA), bevorzugt messenger RNA (mRNA) aus biologischen Proben, also in Gegenwart genomischer homologer DNA. Die Prozessierung der Lysemischung besteht in diesem Falle erfindungsgemäß in einem DNase-Verdau während des Nukleinsäuretransferschrittes. Da die Elektrolytlösung im allgemeinen einen pH-Wert von $7,25 \pm 0,5$ aufweist, kann bei Verwendung einer DNase mit einem $pI > 7$, bevorzugt pI 8 - 9, dieser Prozeß in einer Vorrichtung nach Fig. 7d durchgeführt werden. Die aus der biologischen Probe hervorgehende detergenshaltige Lysemischung wird in die Kathodenkammer (6) eingefüllt, der Reaktionskanal mit Elektrolyt befüllt und der Transfer durch Anlegen einer Spannung an die Elektroden gestartet. Zellreste und grobe Verunreinigungen bleiben an dem Gewebe (5) hängen. Statt dem Gewebe kann auch ein drittes formstabilisiertes Agarosegel zum Einsatz gelangen. Nukleinsäuren, in diesem Falle DNA und RNA passieren diesen Zwischeneinbau zusammen mit dem Detergens, wenn es ebenfalls negativ geladenen ist. Das Detergens wandert jedoch schneller und passiert teilweise auch das anschließende formstabilisierte Gel (33). Auf diese Weise wird die Kammer (35) detergensfrei und ein DNA-Abbau kann mittels DNase, die durch Detergentien inhibiert wird, durchgeführt werden. Dazu wird die Spannung unterbrochen und eine DNase-Lösung wird in die Reaktionskammer (35) zugegeben ggf. kurz inkubiert und anschließend der Transferprozeß fortgesetzt. Nach dem Abbau der DNA kann durch die

20
25
30

geeignete erfinderische Wahl des pI-Wertes der DNase, erreicht werden, daß diese von der zurückbleibende RNA separiert wird und eine RNA-Preparation DNase-frei aus der Kammer (7) entnommen werden kann. Das entsprechende Detergens ist derweil durch das formstabilisierte Gel (33a) bis in Anodenkammer (8) vorgedrungen. Die DNase ist auf Grund ihres pI-Wertes z.B. positiv geladen und wandert in entgegengesetzte Richtung zur RNA. Bei einer etwas abgewandelten Anwendung erfolgt der DNA-Verdau mittels festphasengebundener DNase, die in Kammer (35) pipettiert wird. Diese Variante hat den Vorteil, daß sie unabhängig vom pI der eingesetzten DNase ist. Dies gilt auch bei Verwendung von thermolabilen DNasen, die bei der anschließenden RT-PCR z.B. in einem ersten Heizschritt zerstört werden kann.

Eine weitere Anwendung, die die bisher notwendige Unterbrechung der Stromzufuhr für einen Pipettierschritt umgeht, was wiederum für eine schnelle automatische Abarbeitung hinderlich ist, nutzt eine DNase mit einem pI kleiner als der pH-Wert des Elektrolyten. In diesem Falle wandert die Nuklease zusammen mit der Nukleinsäure. Durch Verwendung einer Vorrichtung nach Fig. 7e mit einem gegenüber Fig. 7d zusätzlichen formstabilisierten Gel (33b) bei der Kathode (3), bei der die Nuklease mit dem Elektrolyten in die Reaktionskammer (35b) eingefüllt und die lysierte Probe in Probeneintragskammer (10) wird, wandert die Nuklease langsamer als das Detergens jedoch schneller als die DNA aus der Probe und zerstört diese.

25

Neben den oben erwähnten Möglichkeiten der Deaktivierung der Nuklease besteht erfindungsgemäß die Möglichkeit, Festphasen-gebundene Antikörper gegen die Nuklease oder Festphasen-gebundene Proteinase K in das formstabilisierte Gel (33) einzubringen, die das Enzym binden bzw. abbauen und somit deaktivieren. Solche Prozesse würden dann z.B. wie folgt in Vorrichtungen nach Fig. 7d ablaufen: Die Kammer (6) wird mit der lysierten Probe und die übrigen Kammern mit Elektrolyt befüllt. Die Elektroelution

30

wird gestartet und nach 1-5 min, bevorzugt jedoch 1-2 min unterbrochen. Anschließend wird Festphasen-gebundene DNase in die Reaktionskammer (35) eingefüllt und inkubiert. Anschließend wird die Elektroelution fortgesetzt und die DNA-freie Probe aus der Probenentnahmekammer (7) entnommen. Es hat sich gezeigt, daß in der Praxis ein geringer Anteil an DNase sich bei diesem Prozeß ablösen kann und je nach pI-Wert mit der Probe in die Probenentnahmekammer (10) wandert, was für die weitere Verarbeitung ungünstig ist. In diesem Falle kann erfindungsgemäß Festphasen-gebundene Proteinase K oder aber Antikörper gegen die DNase in löslicher oder Festphasen-gebundener Form in die Reaktionskammer (35) vor dem erneuten Start der Elektroelution gegeben werden, so daß die DNase deaktiviert wird. Dabei muß Sorge getragen werden, daß vor allem Proteinase K nicht in die Probenentnahmekammer (10) gelangt, da diese z.B. die anschließende PCR dahingehend stören kann, daß die dort verwendete Taq-Polymerase deaktiviert wird. Der pI der vollständigen Proteinase K liegt bei pH 6,60, wogegen der pI eines besonders aktiven Teilfragments (Aminosäuren 106 – 384) bei 8,25 liegt. Besonders dieses Fragment eignet sich für die erfinderische Anwendung, da es bei neutralem pH positiv geladen ist und zur Kathode wandert und nicht in den Probenentnahmeraum wandert.

Eine weitere Möglichkeit besteht auch, daß Festphasen-gebundene Proteinase K oder aber Festphasen-gebundene Antikörper gegen die DNase in das noch flüssige Gel gegeben und dadurch in einer formstabilisierten Gelschicht vorgehalten werden, was wiederum einen Pipettierschritt einspart. Eine vergleichbare Anwendung ist die Entfernung von RNA aus einem DNA/RNA-Gemisch durch Behandlung mit RNase oder die Isolierung von Proteingemischen mit analogen Methodiken.

Eine weitere erfinderische Lösung ist die Anwendung von Puffern mit unterschiedlichem pH-Werten in den verschiedenen Kammern der hier beschriebenen Vorrichtungen. Je nach pI Werten der zugesetzten Proteine

oder Enzyme kann eine benachbarte Kammer mit einem pH-Wert dergestalt befüllt werden, daß die gewünschten geladenen Moleküle wie z.B. Nukleinsäuren diese Kammer passieren, die Zuschlagstoffe jedoch nicht. Eine denkbare Anwendung ist in Fig. 7g in der Perspektive und in Fig. 7h im

5 Schnitt dargestellt. Es handelt sich um ein Agaroseflachbettgel (36) mit drei eingearbeiteten Aufnahmetaschen, die als Probeneintragskammer (10), Reaktionskammer (35) und Probenentnahmekammer (7) genutzt werden. Es ist dabei Sorge zu tragen, daß der Elektrolyt nicht über den oberen Rand des

10 Flachbettgels steigt, um eine Vermischung der diversen Reaktanten vor allem in Kammer (35) zu vermeiden. In solchen Vorrichtungen sind die hier beschriebenen Prozesse nicht durchführbar, da in Folge von EOF die Kammern (35) und (7) leer laufen und somit keine stabile Elektroelution möglich ist.

15 Die Erfindung wird durch die beigefügten Figuren und Beispiele weiter erläutert. Die Figuren zeigen:

- | | |
|------------|---|
| Fig. 1a | Perspektivische Ansicht: Rechteckiger Reaktionskanal mit Zwischeneinbau |
| 20 Fig. 1b | Aufsicht: Rechteckiger Reaktionskanal mit Einschnürung |
| Fig. 1c | Grundelement |
| Fig. 1d | Zwischeneinbau |
| Fig. 1e | Dichtelement |
| Fig. 1f | Elektrodenaufnahme |
| 25 Fig. 1g | Aufnahme mit Spannvorrichtung |
| Fig. 1h | Mikrotitrationsrahmen mit 48 Reaktionskanälen |
| Fig. 1i | Grundelement mit Elektrodenaufnahmen und Klemmung |
| Fig. 1j | Grundelement mit Öffnung und Klemmung |
| Fig. 2a | Aufsicht: Reaktionskanal mit Zwischeneinbau |
| 30 Fig. 2b | Schnitt: Reaktionskanal mit Zwischeneinbau |
| Fig. 3 | Reaktionskanal mit zwei Zwischeneinbauten |
| Fig. 4 | Reaktionskanal mit Flüssigkeitssperre |

- Fig. 5a Flüssigkeitssperre offen
Fig. 5b Flüssigkeitssperre geschlossen
Fig. 6 Reaktionskanal mit Flüssigkeitssperre und Membrane
Fig. 7a Vorrichtung zur Elektroelution mit formstabilisiertem Gel nach
5 Variante A
Fig. 7b Vorrichtung zur Elektroelution mit formstabilisiertem Gel nach
Variante B Fig. 7c Vorrichtung mit drei Kammern
Fig. 7d Vorrichtung mit zwei formstabilisierten Gelschichten
Fig. 7e Vorrichtung mit drei formstabilisierten Gelschichten
10 Fig. 7f Perspektivische Sicht eines Flachbettgels mit
Reaktionskammern
Fig. 7g Schnitt durch ein Flachbettgel mit Reaktionskammern
Fig. 8 Reaktionskanal mit Dauermagnet
Fig. 9a Vorrichtung für Elektroelution
15 Fig. 9b Vorrichtung für Elektroelution mit Fritte
Fig. 9c Vorrichtung für Elektroelution mit Partikeln
Fig. 10a Agarosegelstückchen vor und nach Elektroelution
Fig. 10b Agarosegel für Elektroelution mit Vorrichtung Fig. 9a
Fig. 11 Agarosegel für Elektroelution mit Vorrichtung Fig. 9b
20 Fig. 12 Agarosegel für Nukleinsäureisolierung aus Hefe mittels
Elektroelution in Fig. 9c
Fig. 13 Standardagarosegel zur Analyse der Elektroelution nach
Beispiel 5
Fig. 14 Standardagarosegel zur Analyse der Elektroelution nach
25 Beispiel 7
Fig. 15 Standardagarosegel auf einem Träger aus gesinterem
Kunststoff (Beispiel 10)
Fig. 16 Standardagarosegel zur Analyse der Isolierung genomische
DNA und RNA aus Hefe Beispiel 11.
30 Fig. 17 Standardagarosegel nach PCR mit verschiedenen
Elektroeluat

- Fig. 18 Standardagarosegel zur Analyse der Isolierung genomische DNA aus Hefe vor Amplifikation.
- Fig. 19 Standardagarosegel zur Analyse der Isolierung genomische DNA aus Hefe nach Amplifikation.
- 5 Fig. 20 Standardagarosegel zur Analyse der Isolierung genomische DNA aus Hefe vor Amplifikation mit Einsatz eines Detergensadsorbers.
- Fig. 21 Standardagarosegel zur Analyse der Isolierung genomische DNA und RNA aus Hefe nach Amplifikation mit Einsatz eines Detergensadsorber
- 10 Fig. 22 Standardagarosegel zur Analyse der Isolierung genomische DNA aus Hefe vor Amplifikation mit Einsatz eines Zweikomponentenpuffersystems.
- Fig. 23 Standardagarosegel zur Analyse der Isolierung genomische DNA und RNA aus Hefe nach Amplifikation mit Einsatz eines Zweikomponentenpuffersystems.
- 15 Fig. 24 Standardagarosegel zur Analyse der Isolierung genomische DNA aus Hefe nach Amplifikation in einer Kinetik.
- Fig. 25 Elektroelution eines Fluoreszenzfarbstoffs in einer Vorrichtung mit vier Kammern, wobei der geladene Farbstoff durch ein formstabilisiertes Gel wandert.
- 20

Der Aufbau der verwendeten Vorrichtung ist wie folgt (von links nach rechts:)

- 25 Kathode, Kathodenraum, Membran, Probeeintragskammer, formstabilisiertes Gel, Probeentnahmekammer, formstabilisiertes Gel, Anodenkammer, Anode.

Zu beachten ist, daß nach einer kurzen Zeit von 120 s der geladene Farbstoff bereits vollständig in die Probeentnahmekammer überführt ist, ohne daß ein Fluoreszenzfarbstoff in der Anodenkammer sichtbar wäre.

30

Fig. 26 Schematische Darstellung der Vorrichtung von Figur 25.

Fig. 27 Ergebnisse eines Radioimmunoassays mittels Elektroelution.

Bezugszeichenliste:

- (1) Nach unten geschlossener Grundkörper
- 5 (2) Nach oben offener Kanal
- (3) Elektrode A, z.B. Kathode
- (4) Elektrode B, z.B. Anode
- (5) Gewebe
- (6) Kathodenraum bzw. -kammer
- 10 (7) Probenentnahmeraum bzw. -kammer
- (8) Anodenraum bzw. -kammer
- (9) Klemmkonus bzw. -kammer
- (10) Probeneintragsraum bzw. -kammer
- (11) Elektrophoresetrennstrecke
- 15 (12) Führung in Grundkörper für Einbauelemente
- (13) Flüssigkeitssperre
- (14) Semipermeable Membran
- (15) Reaktionsraum bzw. -kammer (offen)
- (16) Rastnase
- 20 (17) Dauermagnet
- (18) Mikrotitrationsplattenrahmen
- (19) Mikrotitrationsplattenstreifen
- (20) Paßfläche
- (21) Integriertes Verbindungselement
- 25 (22) Festphase
- (23) Spannvorrichtung
- (24) Grundelement
- (25) Dichtelement
- (26) Aufnahme
- 30 (27) Fritte
- (28) Zwischeneinbauten
- (29) Laminierfolie

- (30) Elektrische Zuleitung
- (31) Öffnung zum Reaktionskanal
- (32) Einschnürung
- (33) Formstabilisiertes Gel
- 5 (34) Gelschicht
- (35) Reaktionskammer
- (36) Agaroseflachbettgel

Beispiele

10 1.) Messung des elektroosmotischen Flusses

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung nach Abb. 9a mit zwei Geweben (5) [Nr. 07/5/1 Fa. SEFAR, Rüschlikon, Schweiz] und einer semipermeablen Membran (14) [Size 3; Fa. Medicell Int. Ltd., London, UK] eingesetzt, die dann einen Kathodenraum (6), einen Probeneintragsraum (10) und einen Anodenraum (8) abgrenzen. Dabei wurde die Vorrichtung aus einzelnen Grundelementen nach Fig. 1c [Nr.: 011 1120 005 05; J. Pützfeld B. V., Amsterdam, Niederlande] zusammengesetzt. Für Anoden- und Kathodenraum wurden jeweils 3 Elemente verklebt, das Gewebe (5) und die semipermeable Membran (14) wurden jeweils in eine gelochte Laminierfolie [250 μ m Dicke, Nr. 54x86; Fa. Böttcher, Jena] mit einem Laminiergerät [Fa. Lamirel MAXIPLAST 335 E] eingeschweißt und mit Silikondichtungen [1 mm Dicke Nr. 6084.0810, Fa. H. Wegener, Hamburg] zwischen die o.g. Grundelemente flüssigkeitsdicht mit einer Schraubklemmvorrichtung eingeklemmt. Als Elektroden (3,4) dienten Aluminiumplättchen und als Stromquelle wurde ein Elektrophoresetransformator [Fa. Hölzel] eingesetzt.

Die Vorrichtung wurde mit Elektrophoresepuffer (10 mM Tris/Acetate [Fa. Roth, Karlsruhe], 1 mM EDTA [Fa. Sigma], pH 8,0) befüllt und an die Elektroden (3,4) eine Spannung von 40 - 80 V bei konstant 10 mA für 10 min angelegt. Nachfolgende Tabelle zeigt die Volumina in den einzelnen Kammern vor und nach Elektroelution.

	Kathoden- raum (6)	Proben- eintragsraum (10)	Proben- entnahmeraum (7)
Vor Elektroelution	750 μ l	250 μ l	250 μ l
Nach Elektroelution	870 μ l	240 μ l	55 μ l

Diese Experiment zeigt die Verringerung des Puffervolumens im Probenentnahmeraum (7). Für alle nachfolgenden Beispiele wurden Materialien wie Beispiel 1.) verwendet, falls nicht anders angegeben.

2.) Elektroelution von DNA aus Agarosegelen

2,5 μ g DNA (λ Hind III) [Nr. #SM0101; MBI Fermentas, St. Leon-Roth] wurde in ein Standard-Flachbettagarosegel (0,8 % Agarose [Fa. Sigma, München]) in einem Elektrophoresepuffer (s.o.) mit Laufzeit von 10 min. (ca. 3 V/cm) in das Gel überführt und die Bande nach Standardvorschrift mit SYBR[®]-Gold [S-11494; Fa. Mo Bi Tec, Göttingen] angefärbt. Das korrespondierende, die DNA enthaltende Gelstückchen wurde mit einem Skalpell ausgeschnitten und ist in Abb. 10 a vor und nach Elektroelution dargestellt.

Das ausgeschnittene Agarosegel wurde in den Probeneintragsraum gebracht und die gesamte Vorrichtung nach Abb. 9 a wurde mit 1,9 ml Elektrophoresepuffer (s.o.) gefüllt. An die Elektroden wurde mit einem Elektrophoresetransformator eine Spannung zwischen 40 - 60 V bei konstant 10 mA für 7 bzw. 10 min. angelegt.

Fig. 10 b zeigt das Ergebnis der Elektroelution in einem Standardagarosegel (s.o.):

Spur	Inhalt
1	Inhalt Probeneintragsraum nach 7 min Elution
2	Inhalt Probenentnahmeraum nach 7 min Elution
3	Inhalt Probeneintragsraum nach 10 min Elution
4	Inhalt Probenentnahmeraum nach 10 min Elution
5	Marker: λ Hind III: 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56 KB

3) Elektroelution mit einer Vorrichtung nach Abb. 9b

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung nach Abb. 9b mit einem Gewebe (5), einer Fritte aus gesinterem Kunststoff [Nr. XS-5616, Fa. Porex. Technologies GmbH, Singwitz] und einer semipermeablen Membran (14) eingesetzt, die dann einen Kathodenraum (6), einen Probeneintragsraum (10) und einen Anodenraum (8) abgrenzen. Dabei wurde die Vorrichtung zusammengesetzt wie in Beispiel 1 beschrieben.

2,5 μ g DNA (λ Hind III) wurde direkt in den Probeneintragsraum gebracht und die gesamte Vorrichtung nach Abb. 9 b wurde mit 1,75 ml Elektrophoresepuffer (siehe Beispiel 1) gefüllt. An die Elektroden wurde mit einem Elektrophoresetransformator eine Spannung von 70 V bei konstant 10 mA für 10 min. angelegt.

Fig. 11 zeigt das Ergebnis der Elektroelution in einem Standardagarosegel (s.o.) mit Entnahmen aus Probeneintragsraum und unmittelbar daneben Probenentnahmeraum in einer Kinetik von 0 – 10 min. M bezeichnet die Spur des Markers wie in Beispiel 1.

4.) Isolierung von Nukleinsäure aus Hefe mittels Magnetpartikeln und Elektroelution

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung mit einem Gewebe (5) [Fa. SEFAR siehe Beispiel 1] und einer Dialysemembran [Fa. Medicell siehe
5 Beispiel 1] wie in Fig. 9c verwendet.

1 x 10¹⁰ Hefezellen pro ml (*Saccharomyces cerevisiae*) wurden in Lyticasepuffer (1M Sorbit [Fa. AppliChem, Darmstadt], 100 mM Natriumcitrat [Fa. ICN, Aurora, USA], 60 mM EDTA [Fa. Sigma], 50 mM
10 Dithioerythrit [Fa. Roth], pH 7,5) aufgenommen und 10 µl (10⁸ Zellen) davon mit 1 µl Lyticase [Nr. 1372 467, Roche Diagnostics, Mannheim] versetzt und 15 min bei 37 °C inkubiert.

Die Lyse sowie die Bindung und das Waschen der Magnetpartikel erfolgten
15 nach US 5 705 628. Nach dem letzten Waschschrift wurden die Magnetpartikel abgetrennt, die Waschlösung sorgfältig entfernt und die Partikel in 150 µl Elutionspuffer (Elektrophoresepuffer siehe Beispiel 1) aufgenommen. Anschließend wurde die Suspension in die Probeneintragskammer (in diesem Falle identisch mit dem Kathodenraum
20 (6)) einer bereits mit Elutionspuffer befüllten Vorrichtung nach Fig. 9 c gefüllt. Die Elektroelution erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 40 – 70 V bei 10 mA Stromfluß für 5 min. Die Nukleinsäure wurde aus der Entnahmekammer pipettiert und einer Agarosegelelektrophorese wie in
Beispiel 1 unterworfen. Fig. 12 zeigt das dazugehörige Gelbild.

25

30

Spur	Inhalt
1	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution
2	Probeneintragsraum (10) nach Elektroelution
3	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution
4	Marker (λ-HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56 KB

5.) Elektroelution mit einer Vorrichtung nach Fig. 7a

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung nach Fig. 7a mit einem Gewebe (5) [Nr. 07/5/1 Fa. SEFAR, Rüschlikon, Schweiz] und einer semipermeablen Membran (14) [Size 3; Fa. Medicell Int. Ltd., London, UK] eingesetzt, die zunächst einen Kathodenraum (6) und einen Anodenraum (8) abgrenzen. Darüber hinaus ist zwischen diesen beiden Einbauten ein formstabilisiertes Gel (33) eingebracht, das einen Probeneintragsraum (10) und einen Probenentnahmeraum (7) mit jeweils ca. 250 μ l Volumen abgrenzt. Dabei wurde die Vorrichtung aus einzelnen Grundelemente [Nr.: 011 1120 005 05 J. Pützfeld B.V., Amsterdam, Niederlande] zusammengesetzt. Für Anoden- (8) und Kathodenraum (6) wurden jeweils 3 Elemente mit einem Volumen von ca. 750 μ l verklebt, das Gewebe (5) und die semipermeable Membran (14) wurden jeweils in eine gelochte Laminierfolie [250 μ m Dicke, Nr. 54x86; Fa. Böttcher, Jena] eingeschweißt mit einem Laminiergerät [Fa. Lamirel MAXIPLAST 335 E] und mit Silikondichtungen [1 mm Dicke Nr. 6084.0810, Fa. H. Wegener, Hamburg] zwischen die o.g. Elemente flüssigkeitsdicht mit einer Schraubklemmvorrichtung eingeklemmt.

Nach Variante A wurde das Gel wie folgt formstabilisiert: Ein gesinterter Kunststoff [Porenweite 45 – 90 μ m, Nr. X-4899, Fa. Porex., Singwitz] wurde in einer erwärmten Mischung aus Agarose (0,4 % - 3 %) [Fa. Sigma, München] und Elektrophoresepuffer 10 mM Tris/Acetate [Fa. Roth, Karlsruhe] mit 1 mM EDTA [Fa. Sigma] pH 8,0 gelegt, die Agarose wurde fest werden lassen und das so formstabilisierte Gel (33) wurde in die Vorrichtung nach Fig. 7a eingebracht.

2,5 μ g DNA (λ Hind III) [Nr. #SM0101; MBI Fermentas, St. Leon-Rot] wurde direkt in den Probeneintragsraum gebracht und die gesamte Vorrichtung wurde mit 1,75 ml Elektrophoresepuffer (siehe zuvor) gefüllt. An die Elektroden wurde mit einem Elektrophoresetransformator [Fa. Hölzel,

Dorfen] eine Spannung von 50 - 500 V bei konstant 10 mA für 10 min. angelegt.

Fig. 13 zeigt das Ergebnis der Elektroelution mit verschiedenen Agarosekonzentrationen im formstabilisierten Gel, wobei in einer Kinetik von 0 - 10 min sowohl Entnahmen aus Probeneintragsraum (10) als auch aus dem Probenentnahmeraum (7) mittels einem 0,8 % Standardagarosegel (s.o.) analysiert wurden. Unter der Überschrift "Gelspuren" ist die Zeit angegeben, nach der DNA auf einem Gel nachweisbar war.

10 **Agarose-konz Gelspuren**
 in formstabil.

Gel (33)

Marker (λ -HindIII): 23,1 | 9,4 | 6,6 | 4,4 | 2,3 | 2,0 | 0,56
 KB

	0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 0 min.
15	0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 0 min
	0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 1 min.
	0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 1 min
	0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 2 min.
	0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 2 min
20	0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 3 min.
	0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 3 min
	0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 4 min.
	0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 4 min
	0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 5 min.
25	0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 5 min
	0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 7 min.
	0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 7 min
	0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 10 min.
	0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 10 min
30		Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56KB

	0,8 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 0 min.
	0,8 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 0 min
	0,8 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 1 min.
	0,8 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 1 min
5	0,8 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 2 min.
	0,8 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 2 min
	0,8 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 3 min.
	0,8 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 3 min
	0,8 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 4 min.
10	0,8 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 4 min
	0,8 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 5 min.
	0,8 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 5 min
	0,8 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 7 min.
	0,8 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 7 min
15	0,8 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 10 min.
	0,8 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 10 min
		Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56KB
	1,2 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 0 min.
	1,2 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 0 min
20	1,2 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 1 min.
	1,2 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 1 min
	1,2 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 2 min.
	1,2 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 2 min
	1,2 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 3 min.
25	1,2 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 3 min
	1,2 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 4 min.
	1,2 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 4 min
	1,2 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 5 min.
	1,2 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 5 min
30	1,2 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 7 min.
	1,2 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 7 min

	1,2 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 10 min.
	1,2 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 10 min
		Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56KB
	3,0 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 0 min.
5	3,0 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 0 min
	3,0 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 1 min.
	3,0 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 1 min
	3,0 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 2 min.
	3,0 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 2 min
10	3,0 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 3 min.
	3,0 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 3 min
	3,0 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 4 min.
	3,0 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 4 min
	3,0 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 5 min.
15	3,0 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 5 min
	3,0 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 7 min.
	3,0 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 7 min
	3,0 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 10 min.
	3,0 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 10 min

20

Man erkennt die Abnahme der Menge an DNA (λ Hind III) im Probeneintragsraum (10) und die Zunahme im Probenentnahmeraum (7). Darüber hinaus werden die Banden mit kleinerem Molekulargewicht bei höheren Agarosekonzentrationen zurückgehalten, so daß auf diese Art und Weise mit einem formstabilisiertem Gel eine Selektionierung von bestimmten Nukleinsäuren erreicht werden kann.

25

6.) Messung des elektroosmotischen Flusses mit einer Vorrichtung nach Fig. 7a

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung nach Fig. 7a und mit einem formstabilisierten Gel der Variante A mit 0,8 % Agarose betrieben. Alle weiteren experimentellen Bedingungen sind wie Beispiel 1. Die Endvolumina des Probeneintragsraums (10) und des Probenentnahmeraums (7) sind in einer Kinetik von 2 – 10 min. in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Zeit [min]	Volumen in μ l Probeneintragsraum (10)	Volumen in μ l Probenentnahmeraum (7)
2	263	237
5	244	230
7	133	203
10	71	150

Durch Einsatz eines formstabilisierten Gels verringert sich das Volumen in dem Probenentnahmeraums (7), so daß die eluierte Nukleinsäure entsprechend aufkonzentriert wird.

7.) Elektroelution mit einer Vorrichtung nach Fig. 7b

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung nach Fig. 7b eingesetzt, die ein formstabilisiertes Gel nach Variante B enthält. Die Herstellung wurde wie folgt durchgeführt: Zwei Lagen Gewebe (5) in einem Abstand von ca. 2 mm in die Vorrichtung gebracht und der Zwischenraum wurde mit einer erwärmten Mischung aus Agarose (0,4 %) und Elektrophoresepuffer befüllt. Die Agarose wurde erkalten und somit fest werden lassen.

2,5 μ g DNA (λ Hind III) wurde direkt in den Probeneintragsraum (10) gebracht und die gesamte Vorrichtung wurde wie Beispiel 5 betrieben und das Resultat aus der Probenentnahmekammer (7) entnommen und analysiert. Fig. 14 zeigt das Ergebnis der Elektroelution, wobei sowohl

Entnahmen aus Probeneintragsraum (10) als auch aus dem Probenentnahmekammer (7) mittels einem 0,8 % Standardagarosegel (s.o.) in einer Elutions-Kinetik von 0 – 10 min analysiert wurden.

Agarose-konz Gelspuren

5 **in formstabil.**

Gel (33)

		Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56KB
	0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 0 min.
	0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 0 min
10	0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 1 min.
	0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 1 min
	0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 2 min.
	0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 2 min
	0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 3 min.
15	0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 3 min
	0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 4 min.
	0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 4 min
	0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 5 min.
	0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 5 min
20	0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 7 min.
	0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 7 min
	0,4 %	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution 10 min
	0,4 %	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution 10 min

25 Das Ergebnis entspricht den Daten in Beispiel 5.

8.) Messung des elektroosmotischen Flusses mit einer Vorrichtung nach Fig.

7b

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung nach Fig. 7b und Beispiel 7
 30 mit einem formstabilisierten Gel der Variante B mit 0,4 % Agarose

eingesetzt. Die gesamte Vorrichtung nach Fig. 7b wurde wie Beispiel 1 betrieben.

- Die Endvolumina des Probeneintragsraums (10) und des Probenentnahmekammer (7) sind nach 10 min. in der folgenden Tabelle zusammengestellt:

Zeit [min]	Volumen in μl Probeneintragsraum (10)	Volumen in μl Probenentnahmeraum (7)
0	250	250
10	320	> 10

Durch Einsatz eines formstabilisierten Gels verringert sich das Volumen in dem Probenentnahmekammer (7), so daß die eluierte Nukleinsäure entsprechend aufkonzentriert wird.

9.) Elektroelution mit einer Vorrichtung nach Fig. 7c mit geringeren Stromspannungen

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung nach Fig. 7c und Beispiel 5 mit einem formstabilisierten Gel (33) der Variante A mit 0,8 % Agarose eingesetzt. Die gesamte Vorrichtung im Gegensatz zu Beispiel 5 betrieben mit eine 10 fach konzentrierten Elektrophoresepuffer im Anodenraum (6). 10 mA wurden bei dieser Anordnung mit einer Spannung von 20 - 25 V erreicht. Die Volumina wurden vor uns nach Elektroelution wie folgt bestimmt:

Zeit [min]	Volumen in μl Kathodenraum (2)	Volumen in μl Probenentnahmeraum (8)
0	750	250
10	766	232

Dieses Beispiel zeigt bei niedrigem Spannungsbereich für die Elektroelution ein Minimum an elektroosmotischen Fluß, was für einige Anwendungen auch von Vorteil sein kann.

- 5 Dieses Ergebnis zeigt, daß mit erheblich geringerer Stromspannung eine Elektroelution durchgeführt werden kann, was bei einer entsprechenden Automatisierung eine erhebliche Vereinfachung darstellt, da für diese Stromspannungen anderen Sicherheitsrichtlinien gelten.

Werden Anodenraum und Kathodenraum wie in Beispiel 11 mit Puffer
10 höherer Konzentration beschickt, so erniedrigt sich die Spannung auf unter 10 V.

10.) Einsatz eines Agarosegels auf einem Träger aus gesintertem Kunststoff
Ein Standardagarosegel (0,8 %) wurde auf einen gesinterten Kunststoff [X
15 4588, Fa. Porex, Singwitz] gegossen und erkalten lassen. Mit diesem Gel wurde DNA (λ Hind III) aufgetragen, eine Elektrophorese durchgeführt und angefärbt (s.o.). Fig. 15 zeigt das Ergebnis.

11.) Elektroelution mit einer Vorrichtung nach Fig. 7f in Gegenwart von
20 **Natriumdodecylsulfat (SDS)**

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung nach Fig. 7f mit einer Dialysemembran (14) [Fa. Medicell siehe Beispiel 1] und zwei formstabilisierten Gelen (33 und 33a) verwendet.

Dabei war die Agarose-Konzentration in (33) 0,2 % und in (33a) 2 % mit
25 Formstabilisierung nach Variante A.

30 μ l (10^8 Zellen) einer Hefezellsuspension (*Saccharomyces cerevisiae*) wurden mit 115 μ l BILATEST-Lysepuffer I bestehend aus 5 % Natriumdodecylsulfat [L4390 Fa. Sigma, München], 100 mM Tris/HCl [T2584 L4390 Fa. Sigma, München], 10mM EDTA [E5134 Fa. Sigma, München] und 5 μ l einer Proteinase K-Lösung [1 373 196, Fa. Roche, Mannheim] 1 Stunde bei 55 °C inkubiert und in die Probeneintragskammer (10) überführt.

Anoden-(8) und Kathodenraum (6) wurden jeweils beide mit 600 μ l eines 10fach konzentrierten Elektrophoresepuffers wie Beispiel 1 und die übrige Kammern (7) mit 150 μ l eines 1fach Konzentrats befüllt.

- Die Elektroelution erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 7,5 V bei 10 mA Stromfluß für 5 min bzw. 10 min durchgeführt. Die Nukleinsäure wurde aus der Entnahmekammer (7) pipettiert und einer Agarosegelelektrophorese wie in Beispiel 1 unterworfen. Fig. 16 zeigt das dazugehörige Gelbild.

<i>Spur</i>	<i>Inhalt</i>
10 M	Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56 KB
0-	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution
5-	Probeneintragsraum (10) nach Elektroelution für 5 min.
5+	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 5 min.
10-	Probeneintragsraum (10) nach Elektroelution für 10 min.
15 10+	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 10 min.
M	Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56 KB

Das Gelbild zeigt die genomische DNA sowie RNA.

20 12) Abreicherung von Natriumdodecylsulfat mittels Elektroelution

- Bei diesem Experiment wurde eine Vorrichtung nach Fig. 7f mit einem analogen Aufbau wie Beispiel 11 eingesetzt. Formstabilisiertes Gel (33) wurde mit 0,4 % Agarose und (33a) mit 4 % Agarose hergestellt. In die Probeneintragskammer (10) wurde eine Natriumdodecylsulfatlösung in Elektroephoresepuffer (siehe zuvor) in einer Konzentration von 0,1 % bzw. 1 % eingesetzt und einer Elektroelution wie in Beispiel 11 unterworfen. Danach wurden 1 μ l der Lösungen aus Probeneintragskammer (10), Probenentnahmekammer (7) und der Anodenkammer (8) zu einer Standard-PCR des BCY-Gens der Hefe geben, wie in Beispiel 13 näher beschrieben.
- Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegel analysiert und Fig. 17 zeigt das Ergebnis.

5

Spur	Inhalt
V	Zugabe von 1 μ l aus Probeneintragsraum (10) zur PCR bei 0,1 % SDS Ausgangskonzentration Frei Zugabe von 10 μ l aus Probeneintragsraum (10) zur PCR bei 0,1 % SDS Ausgangskonzentration
N	Zugabe von 1 μ l aus Probenentnahmeraum (7) zur PCR bei 0,1 % SDS Ausgangskonzentration Frei Zugabe von 10 μ l aus Probenentnahmeraum (7) zur PCR bei 0,1 % SDS Ausgangskonzentration
+	Zugabe von 1 μ l aus Anodenraum (8) zur PCR bei 0,1 % SDS Ausgangskonzentration Zugabe von 10 μ l aus Anodenraum (8) zur PCR bei 0,1 % SDS Ausgangskonzentration
V	Zugabe von 1 μ l aus Probeneintragsraum (10) zur PCR bei 1 % SDS Ausgangskonzentration Zugabe von 10 μ l aus Probeneintragsraum (10) zur PCR bei 1 % SDS Ausgangskonzentration
N	Zugabe von 1 μ l aus Probenentnahmeraum (7) zur PCR bei 1 % SDS Ausgangskonzentration Zugabe von 10 μ l aus Probenentnahmeraum (7) zur PCR bei 1 % SDS Ausgangskonzentration
+	Zugabe von 1 μ l aus Anodenraum (8) zur PCR bei 1 % SDS Ausgangskonzentration Zugabe von 10 μ l aus Anodenraum (8) zur PCR bei 1 % SDS Ausgangskonzentration

Kontrolle	Zugabe von 1 μ l einer 0,1 % SDS-Lösung zur PCR
	Zugabe 10 μ l einer 0,1 % SDS-Lösung zur PCR
	Zugabe von 1 μ l einer 1 % SDS-Lösung zur PCR
	Zugabe von 10 μ l einer 1 % SDS-Lösung zur PCR

- Das Ergebnis zeigt, daß 1 μ l einer 0,1 %igen SDS-Lösung die PCR nicht stört (Kontrolle), während alle höheren SDS-Mengen kein PCR-Produkt mehr zulassen. Dagegen können in diesem Beispiel nach Elektroelution aus der Probenentnahmekammer infolge der SDS-Abreicherung 1 μ l einer 1 % SDS-Lösung ohne Störung auf die PCR eingesetzt werden.

13.) Einfache Isolierung von DNA aus Hefe mit anschließender Amplifikation

- Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung nach Fig. 7f mit einer Dialysemembran (14) [Fa. Medicell siehe Beispiel 1] und zwei formstabilisierten Gelen (33 und 33a) verwendet.

Dabei war die Agarose-Konzentration jeweils 0,15 % in (33) und in (33a) mit Formstabilisierung nach Variante A.

- 30 μ l (10^8 Zellen) einer Hefezellsuspension (*Saccharomyces cerevisiae*) wurden mit 115 μ l BILATEST-Lysepuffer I bestehend aus 2 % Natriumdodecylsulfat [L4390 Fa. Sigma, München], 100 mM Tris/HCl [T2584 L4390 Fa. Sigma, München], 10mM EDTA [E5134 Fa. Sigma, München] und 5 μ l einer Proteinase K-Lösung [1 373 196, Fa. Roche, Mannheim] 1 Stunde bei 55 °C inkubiert und in die Probeneintragskammer (10) überführt.

- Anoden-(8) und Kathodenraum (6) wurden jeweils beide mit 600 μ l eines 10fach konzentrierten Elektrophoresepuffers wie Beispiel 1 und die übrige Kammern (7) mit 150 μ l eines 1fach Konzentrats befüllt.

Die Elektroelution erfolgte durch Anlegen einer Spannung von 7,5 V bei 10 mA Stromfluß für 2 min durchgeführt. Die Nukleinsäure wurde aus der Entnahmekammer (7) pipettiert und einer Agarosegelelektrophorese wie in Beispiel 1 unterworfen. Fig. 18 zeigt das dazugehörige Gelbild.

Spur Inhalt

M	Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56 KB
1	Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution
2	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 2 min.
5	3 Anodenraum (8) nach Elektroelution für 2 min.
M	Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56 KB

Es sei bei diesem Ergebnis daraufhingewiesen, daß keine DNA in der Anodenkammer (8) zu beobachten ist. Überraschenderweise stellt ein formstabilisiertes Gel (33a) zusammen mit einer Anodenkammer (8), befüllt mit einer 10fach höheren Pufferkonzentration wie in der Probenentnahmekammer (10), eine Barriere für die Nukleinsäure dar, vergleichbar zu einer semipermeablen Membran.

Mit dieser isolierten Hefe-DNA wird eine PCR (US 4 683 195) mit den Primern KV80: 5'-GCG GAT CCT TAA GTC CAA TCG TCA AAA TT-3' KV102: 5'-GCG AAT TCG TAT CTT CTT TGC CCA AGG AA-3' [Fa. MWG Biotech AG, Ebersberg bei München] durchgeführt. Mit diesen Primern wird ein 496bp-Fragment aus dem *BCY1*-Gen der Hefe amplifiziert.

Die PCR-Ansätze enthalten die folgenden Bestandteile:

0,5 μ L	Primer-Lösung 1 (50pmol μ L ⁻¹ in H ₂ O bidest)
0,5 μ L	Primer-Lösung 2 (50pmol μ L ⁻¹ in H ₂ O bidest)
2 μ L	dNTP-Lösung, Konzentration der Nukleotide je 5mM
	(Eurogentec, Seraing, Belgien)
4 μ L	MgCl ₂ -Lösung 25mM (Eurogentec)
5 μ L	10x PCR-Puffer (Eurogentec)
0,5 μ	Taq-Polymerase (Eurogentec)
bis zu 30 μ L	DNA- oder Probenlösung

30

in einem Gesamtvolumen von 50 μ L. Während des Ansatzes wird die PCR-Platte auf 4°C gekühlt. Nach Zugeben der letzten Lösung werden die

Proben einmal mit einer Pipette gemischt. Die PCR wird in Thermosprint-Platten [Fa. Innova GmbH, Mannheim) im Primus 96 Plus [MWG Biotech AG, München] durchgeführt. Das Programm umfasst die folgenden Schritte:

- Deckelheizung auf 110 °C
- 5 3 min 94 °C
- 27 Zyklen mit
 - 30 s 94 °C
 - 30 s 50 °C
 - 2 min 72 °C
- 10 5 min 72 °C
- Kühlung auf 4 °C

Nach der PCR werden die Proben mit 15 – 20% Gel-Ladepuffer mit EDTA [Sigma, München] versetzt. Die Amplifikate wurde auf einem Standardagarosegel (1,6%) analysiert. Fig. 19 zeigt das Ergebnis.

15

20

Spur	Inhalt
M	Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56 KB
1	PCR mit Probe aus Probeneintragsraum (10) vor Elektroelution
2	PCR mit Probe aus Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 2 min.
3	PCR mit Probe aus Anodenraum (8) nach Elektroelution für 2 min.
M	Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56 KB

Es wurde in diesem Experiment ohne Waschschrift genomische Hefe-DNA aus einer SDS-haltigen Lysemischung mit Elektroelution gewonnen, die im Anschluß direkt in eine PCR eingesetzt wurde.

25

14.) Einfache Isolierung von DNA aus Hefe mit anschließender Amplifikation und Verwendung eines Detergensadsorbers

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung nach Fig. 7f nach Beispiel 13 durchgeführt.

30

Im Gegensatz zu Beispiel 13 wurde nach Lyse 50 μ l Detergens-Adsorber [Roche Diagnostics Mannheim, Kat. Nr. 1500 678] zugegeben und die resultierende Mischung in die Probeneintragskammer gegeben. Die Elektroelution wurde bei einer Spannung von 10,1 V und 10 mA Strom für 10 min durchgeführt.

Zur Analyse der Amplifikation wurde eine Standardagarosegel durchgeführt (Fig. 20):

Spur	Inhalt
1	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 10 min.
2	Anodenraum (8) nach Elektroelution für 10 min.
M	Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56 KB

Anschließend wurde mit den Eluaten eine PCR nach Beispiel 13 durchgeführt und wie oben analysiert (Fig. 21).

Spur	Inhalt
1	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 10 min. nach PCR
2	Anodenraum (8) nach Elektroelution für 10 min. nach PCR
M	Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56 KB

15.) Einfache Isolierung von DNA aus Hefe mit anschließender Amplifikation und Verwendung eines Zweikomponentenpuffersystems (Tris/HCl- und Phosphatpuffer)

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung nach Fig. 7f nach Beispiel 13 durchgeführt. Im Gegensatz zu Beispiel 13 wurde nach Lyse 50 μ l eines Phosphatpuffers (250 mM pH 7,0) bestehend aus Na_2HPO_4 und NaH_2PO_4

[Merck, Darmstadt, Kat. Nr. 1.06580.1000 bzw. 1.06346.1000] zugegeben und die resultierende Mischung in die Probeneintragskammer gegeben. Die Elektroelution wurde bei einer Spannung von 8,6 V und 10 mA Strom für 10 min durchgeführt.

5

Zur Analyse vor Amplifikation wurde eine Standardagarosegel durchgeführt (Fig. 22):

10

Spur	Inhalt
1	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 10 min.
2	Anodenraum (8) nach Elektroelution für 10 min.
M	Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56 KB

15

Anschließend wurde mit den Eluaten eine PCR nach Beispiel 13 durchgeführt und wie oben analysiert (Fig. 23).

20

Spru	Inhalt
1	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 10 min. nach PCR
2	Anodenraum (8) nach Elektroelution für 10 min. nach PCR
M	Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56 KB

16.) Einfache Isolierung von DNA aus Hefe mit anschließender Amplifikation und Verwendung eines Zweikomponentenpuffersystems (Tris/HCl- und Citratpuffer)

25

Für diese Anwendung wurde eine Vorrichtung nach Fig. 7f nach Beispiel 13 durchgeführt. Im Gegensatz zu Beispiel 13 wurde nach Lyse 15 μ l eines Citratpuffers (1 M pH 4,5) [Applichem, Darmstadt, Kat. Nr.A 2337] zugegeben und die resultierende Mischung in die Probeneintragskammer

gegeben. Die Elektroelution wurde bei einer Spannung von 8,5 V und 10 mA Strom mit Probenentnahmen von 0 - 6 min durchgeführt.

Anschließend wurde mit den Entnahmen eine PCR nach Beispiel 13 durchgeführt und wie oben analysiert (Fig. 24).

5

<i>Spur</i>	<i>Inhalt</i>
M	Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56 KB
1	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 0 min. nach PCR
2	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 0 min. nach PCR
10 3	Anodenraum (8) nach Elektroelution für 0 min. nach PCR
M	Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56 KB
1	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 2 min. nach PCR
2	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 2 min. nach PCR
3	Anodenraum (8) nach Elektroelution für 2 min. nach PCR
15 M	Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56 KB
1	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 4 min. nach PCR
2	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 4 min. nach PCR
3	Anodenraum (8) nach Elektroelution für 4 min. nach PCR
M	Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56 KB
20 1	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 6 min. nach PCR
2	Probenentnahmekammer (7) nach Elektroelution für 6 min. nach PCR
3	Anodenraum (8) nach Elektroelution für 6 min. nach PCR
M	Marker (λ -HindIII): 23,1 9,4 6,6 4,4 2,3 2,0 0,56 KB

Dieser Versuch zeigt, daß amplifiziertes Material nur in der Probenentnahmekammer (7) nachgewiesen wurde.

17.) Herstellung von formstabilisierten Gelen

- 5 Nach Variante A wurde das Gel wie folgt formstabilisiert: Ein gesinterter Kunststoff [Porenweite 45 – 90 μm , Nr. X-4899, Fa. Porex., Singwitz] wurde in einer erwärmten Mischung aus Agarose (0,4 % - 3 %) [Fa. Sigma, München] und Elektrophoresepuffer 10 mM Tris/Acetate [Fa. Roth, Karlsruhe] mit 1 mM EDTA [Fa. Sigma] pH 8,0) gelegt, die Agarose wurde
10 fest werden lassen und das so formstabilisierte Gel (33) wurde in die Vorrichtung nach Fig. 7a eingebracht.

- Nach Variante B wurde die Herstellung eines formstabilisierten Gels wie folgt durchgeführt: Zwei Lagen Gewebe (5) in einem Abstand von ca. 2 mm
15 in die Vorrichtung gebracht und der Zwischenraum wurde mit einer erwärmten Mischung aus Agarose (0,4 %) und Elektrophoresepuffer befüllt. Die Agarose wurde erkalten und somit fest werden lassen.

Variante C mit Acrylamid:

- 20 **18.) Einsatz von formstabilisierten Gelen zur Abtrennung eines immunologisch aktiven Fluoreszenzfarbstoffes**

- In einer Vorrichtung nach Fig. 25, 26 bestehend aus zwei Elektrodenkammern von je 600 μl Volumen, einer Eintragskammer (10) [160 μl] und einer Entnahmekammer [160 μl], mit den Zwischeneinbauten
25 Dialysemembran (14), und zwei formstabilisierten Gelen (33, 33a) nach Variante A mit 0,2 % Agarose wurden die Elektrodenkammern mit je zweimal 600 μl 10fach konzentrierter Elektrophorese-Puffer aus Beispiel 17, die Entnahmekammer (7) mit 150 μl Elektrophorese-Puffer (siehe zuvor) und die Eintragskammer (10) mit einer Lösung aus Cascade®-Blue-Biocytin
30 (0,067 mg/ml) [Molecular Probes, Eugene, USA; Best. Nr.: C-6949] in Elektrophorese-Puffer wie Beispiel 1 befüllt. Die erfindungsgemäße Vorrichtung wurde auf einem UV-Leuchttisch [Fa. Vilbert Lourmat, Marne

la Vallée, Frankreich; Best. Nr.: TFX-20M] gestellt und mit einem Geldetektionssystem [EDAS 120, Fa. Kodak, Rochester USA] versehen. Fig. 25a zeigt die Anordnung zum Zeitpunkt 0 sec. als Ausgangspunkt. In der Eintragskammer (10) ist eine fluoreszierende Bande des Farbstoffes zu sehen. Anschließend wurde eine Spannung von ca. 7,5 V bei konstant 15 mA Stromfluß für 120 sec appliziert. Fig. 25b zeigt eine Bande des Farbstoffes in der Probenentnahmekammer.

Darüber hinaus wurde jeweils 150 µl der Ausgangslösung und der Lösung der Probenentnahmekammer nach Elektroelution in eine Mikrotitrationsplatte [Fa. NUNC, Wiesbaden; Maxisorb] überführt und entsprechend erfaßt.

19.) Einsatz von formstabilisierten Gelen zur Abtrennung eines immunologischen Gemisches aus Fluoreszenzfarbstoffes und Antikörper

Eine Anti-Biotin-Antikörper [Fa. Sigma, St. Louis, USA; Best. Nr.: B 7653] wurde 1:100 in Elektrophorese-Puffer aus Beispiel 2 verdünnt; 100 µl davon wurden mit 100 µl der Cascade®-Blue-Biocytin-Lösung aus Beispiel 18 bei Raumtemperatur 30 min inkubiert und anschließend in einer Anordnung wie Beispiel 18 einer Elektroelution unterworfen.

Nach Elektroelution von 120 sec. kann kaum Fluoreszenz in der Entnahmekammer nachgewiesen werden, da der Farbstoff an dem Antikörper bindet und durch das somit vergrößerte Molekulargewicht nicht durch das formstabilisierte Gel unter den angegebenen Bedingungen wandern kann.

Da die fluoreszierende Eigenschaft des Farbstoffes in Folge der Antikörperbindung gequencht wird und nur der ungebundene Farbstoff nachweisbar ist, wurde zum Nachweis eine Proteinbestimmung nach Bradford mit einem Testkit [Fa. BioRad, München Best. Nr.: 300 0006] in einem Photometer [BioPhotometer; Fa. Eppendorf, Hamburg; Best.Nr.: 6131 000 42] durchgeführt. Danach waren die Proteinkonzentrationen wie folgt:

5

Kammerart	Proteinkonzentration [A600]
Probeneintragskammer vor Elektroelution	0,38
Probenentnahmekammer vor Elektroelution	0,11
Probeneintragskammer nach Elektroelution 2 min	0,09
Probenentnahmekammer nach Elektroelution 2 min	0,11

10

Der Versuch wurde mit einem formstabilisierten Gel mit 2% Agaroseanteil wiederholt:

15

Kammerart	Proteinkonzentration [A600]
Probeneintragskammer vor Elektroelution	0,56
Probenentnahmekammer vor Elektroelution	< 0,1
Probeneintragskammer nach Elektroelution 2 min	< 0,1
Probenentnahmekammer nach Elektroelution 2 min	< 0,1

20

Diese Experimente zeigen, daß der freie Fluoreszenzfarbstoff das formstabilisierte Gel passiert und der Komplex aus Antikörper und Fluoreszenzfarbstoff im formstabilisierten Gel nach Elektroelution verbleibt

25

20.) Einsatz von formstabilisierten Gelen zur Durchführung eines Radioimmunoassays mittels Elektroelution

Ein Testbesteck zum Nachweis von Trijodthyronin (T3) [Fa. Medipan, Selchow; T3-RIA magnum] wurde wie folgt angewandt:

50 µl Probe bzw. Standard wurden mit 50 µl Anti-T3-Antiserum und 50 µl T3-Tracer jeweils aus o.g. Testbesteck für 1,5 Stunden bei Raumtemperatur

inkubiert. Anschließend wurden 80 μ l der Inkubationsmischung und 80 μ l Elektrophoresepuffer (siehe zuvor) gemischt und in den Probeneintragsraum (10) einer 4-Kammer-Vorrichtung wie Fig. 26 mit Anoden-(8) und Kathodenraum (6) jeweils 1,2 ml Volumen befüllt mit 10 fach
5 konzentriertem Elektrophoresepuffer und einer Probenentnahmekammer (7) befüllt mit 160 μ l Elektrophoresepuffer. Es wurden zwei Agarosefilter mit 0,2 % Agarose und eine Dialysemembran eingesetzt. Die Elektroelutionsbedingungen waren 30 mA bei 20 V und einer Laufzeit von 180 sec. Danach wurden 10 μ l aus dem Probeneintragsraum (10)
10 entnommen und in einem Gamma-counter (Fa. Berthold Wildbad; LB 2111) für 2 min. gemessen. Die Ergebnisse sind in Fig. 27 dargestellt.

Da der T3-Tracer dieses Testbestecks an der Carboxylgruppe chemisch modifiziert und das Molekül deswegen ungeladen ist, wandert die
15 gebundene Phase mit dem negativ geladenen Antikörper in das formstabilisierte Gel. Bei Standard "0" wird Tracer gebunden und aus dem Probeneintragsraum (10) entfernt, während bei Standard 4 z.B. Tracer vom Antikörper durch kaltes T3 verdrängt wird und eine größere Menge im Probeneintragsraum (10) verbleibt.

Patentansprüche

1. Vorrichtung zur Isolierung von elektrisch geladenen Molekülen
bestehend aus
einem nach unten geschlossenen Grundkörper (1) mit einem nach
oben offenen Kanal (2) und
zwei Elektroden (3, 4) als rechte und linke äußere Begrenzungen des
Kanals (2),
dadurch gekennzeichnet,
daß zwischen den Elektroden (3,4) im Kanal (2) ein oder mehrere
Zwischeneinbau(ten) (28) angeordnet sind, die den Kanal in zwei
oder mehr Kammern teilen.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1,
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens eine der und insbesondere alle Zwischeneinbauten
(28) einerseits eine Flüssigkeitssperre darstellt, andererseits für
elektrisch geladene Moleküle durchlässig ist.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 und 2,
dadurch gekennzeichnet,
daß mindestens eine der und insbesondere alle Zwischeneinbauten
(28) durch ihre Beschaffenheit den elektroosmotische Fluß so
begrenzt, daß eine Elektroelution von geladenen Molekülen möglich
ist.
4. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sich bei dem Zwischeneinbau um ein formstabilisiertes Gel
(33) handelt.

5. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,
daß es sich bei dem Zwischeneinbau um ein Gewebe handelt.
- 5 6. Vorrichtung nach Anspruch 5,
dadurch gekennzeichnet,
daß durch das Gewebe (5) ein elektroosmotischer Fluß von der
Anode zur Kathode erzeugt wird.
- 10 7. Vorrichtung nach Anspruch 5 oder 6,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Gewebe (5) eine Maschenweite von 0,1 bis 50 μm ,
bevorzugt von 0,5 bis 5 μm besitzt.
- 15 8. Vorrichtung nach nach Anspruch 5 bis 7,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Gewebe (5) in seiner Maschenweite so abgestimmt ist, daß
biologisch aktive Partikel definierter Größe nicht durch das Gewebe
dringen können.
- 20 9. Vorrichtung nach Anspruch 5 bis 8,
dadurch gekennzeichnet,
daß die Absorption der elektrisch geladenen Moleküle an das Gewebe
(5) kleiner 40 %, bevorzugt jedoch kleiner 10 % ist.
- 25 10. Vorrichtung nach Anspruch 5 bis 9,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Gewebe (5) durch Kalandrieren behandelt wurde.
- 30 11. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 3,
dadurch gekennzeichnet,

daß es sich bei dem Zwischeneinbau um eine Flüssigkeitssperre (13) handelt, die sich öffnen und schließen läßt.

12. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 11,
5 **dadurch gekennzeichnet,**
daß durch elektroosmotischen Fluß das Volumen eines Probenentnahmeraums (10) verringert wird.
13. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 12,
10 **dadurch gekennzeichnet,**
daß im Anodenraum (8) und im Kathodenraum (6) ein Puffer mit höherer Konzentration verwendet wird als in den übrigen Kammern.
14. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 13,
15 **dadurch gekennzeichnet,**
daß Puffer mit unterschiedlichem pH-Wert in den Kammern vorgehalten werden.
15. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 14,
20 **dadurch gekennzeichnet,**
daß in den Kammern eine enzymatische Reaktion oder eine Rezeptor/Liganden-Bindung stattfindet.
16. Vorrichtung nach Anspruch 15,
25 **dadurch gekennzeichnet,**
daß die enzymatische Reaktion oder eine Rezeptor/Liganden-Bindung während des elektrophoretischen Transfers von geladenen Molekülen stattfindet.
- 30 17. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 16,
dadurch gekennzeichnet,

daß ein elektroosmotischer Fluß von der Anode zur Kathode erzeugt wird, der zu einer Aufkonzentration im Probenentnahmeraum (7) führt.

- 5 18. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 17,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß die Umgebung mindestens einer Elektrode reversibel einem
 magnetischen Feld ausgesetzt werden kann.
- 10 19. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 18,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß der nach oben offene Kanal eine Verjüngung in der Mitte
 aufweist.
- 15 20. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 19,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß das Volumen des nach oben offenen Kanals (2) 0,01 – 5 ml
 beträgt, bevorzugt von 0,2 – 2 ml.
- 20 21. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 20,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß der nach oben offene Kanal rechteckig oder zylindrisch ist.
- 25 22. Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 21,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß sie aus mehreren Grundelementen flüssigkeitsdicht
 zusammengesetzt ist.
- 30 23. Formstabilisiertes Gel für elektrophoretische Zwecke,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß die Formstabilisierung durch einen Stützelement erreicht wird.

24. Formstabilisiertes Gel nach Anspruch 23,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Stützelement aus einem gesinterten Kunststoff besteht.
- 5 25. Formstabilisiertes Gel nach Anspruch 23 oder 24,
dadurch gekennzeichnet,
daß der gesinterte Kunststoff aus Polypropylen oder -äthylen besteht.
- 10 26. Formstabilisiertes Gel nach Anspruch 23 bis 25,
dadurch gekennzeichnet,
daß der gesinterte Kunststoff eine Porenweite von 1 – 200 μm , bevorzugt von 20 – 120 μm besitzt.
- 15 27. Formstabilisiertes Gel nach Anspruch 23,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Stützelement aus einem oder mehreren Gewebe(n) besteht.
- 20 28. Formstabilisiertes Gel nach Anspruch 27,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Gewebe aus einem Kunststoff, insbesondere aus Polyester oder -amid besteht.
- 25 29. Formstabilisiertes Gel nach Anspruch 28,
dadurch gekennzeichnet,
daß das Gewebe eine Maschenweite von 0,1 – 500 μm , bevorzugt von 0,5 – 10 μm besitzt.
- 30 30. Verwendung eines formstabilisierten Gels nach Anspruch 23 bis 29
für das Separieren der freien von der gebundenen Phase bei Immunoassays.

31. Verwendung des formstabilisierten Gels nach Anspruch 23 bis 29 für das Gelblotting.
- 5 32. Verwendung eines formstabilisierten Gels nach Anspruch 23 bis 29 in Vorrichtungen nach Anspruch 1 bis 4.
33. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 22 für das Separieren der freien von der gebundenen Phase bei Rezeptor-Liganden-Assays.
- 10 34. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 22 zur Isolierung von Nukleinsäuren.
35. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 22 zur Isolierung von Desoxyribonukleinsäuren (DNA) ohne Kontamination durch Ribonukleinsäuren (RNA).
- 15 36. Verwendung einer Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 22 zur Isolierung von Ribonukleinsäuren (RNA) ohne Kontamination durch Desoxyribonukleinsäuren (DNA).
- 20 37. Verfahren zur Isolierung von geladenen Molekülen in Gemischen mit elektrophoretischen Mitteln in einem Reaktionskanal, insbesondere in einer Vorrichtung nach Anspruch 1 bis 22,
- 25 **dadurch gekennzeichnet,**
- daß das Gemisch in flüssiger Form in einen Reaktionskanal eingebracht wird, einer Elektrophorese im Reaktionskanal unterworfen wird, bei dieser Elektrophorese im Reaktionskanal weiter prozessiert wird und nach dieser Prozessierung die isolierten geladenen Moleküle
- 30 in löslicher Form aus dem Reaktionskanal entnommen werden.

38. Verfahren nach Anspruch 37,
dadurch gekennzeichnet,
daß als Gemisch eine lysierte biologische Probe eingesetzt wird.
- 5 39. Verfahren nach Anspruch 37 oder 38,
dadurch gekennzeichnet,
daß ein oder mehrere formstabilisierte Gele den Reaktionskanal in
verschiedene Kammern unterteilen.
- 10 40. Verfahren nach Anspruch 37 bis 39,
dadurch gekennzeichnet,
daß bei der Elektrophorese im Reaktionskanal eine Liganden-Rezeptor-
Bindung stattfindet.
- 15 41. Verfahren nach Anspruch 37 bis 40,
dadurch gekennzeichnet,
daß bei der Elektrophorese im Reaktionskanal eine enzymatische
Reaktion stattfindet.
- 20 42. Verfahren nach Anspruch 37 bis 41,
dadurch gekennzeichnet,
daß bei der Elektrophorese im Reaktionskanal eine Aufkonzentration
stattfindet.
- 25 43. Verfahren nach Anspruch 37 bis 42,
dadurch gekennzeichnet,
daß bei der Elektrophorese der elektroosmotische Fluß so reduziert
wird, daß eine Elektroelution von geladenen Molekülen möglich ist.
- 30 44. Verfahren nach Anspruch 37 bis 43,
dadurch gekennzeichnet,

daß die freie und die gebundene Phase bei einem Liganden-Rezeptor-Assay, insbesondere bei einem Immunoassay getrennt wird und dadurch eine quantitative Bestimmung ermöglicht wird.

- 5 45. Verfahren nach Anspruch 37 bis 44,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß durch Abtrennen von Komponenten mit einer Markierung aus
 einem Gemisch eine quantitative Bestimmung durchgeführt wird.
- 10 46. Verfahren nach Anspruch 45,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß die Markierung aus einem radioaktiven Isotop, einem Enzym,
 einer fluoreszierenden oder lumineszierenden Substanz besteht.
- 15 47. Verfahren nach Anspruch 37 bis 46,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß die Konzentration an Detergens in der entnommenen Lösung mit
 den isolierten geladenen Molekülen kleiner ist als die Konzentration
 der ursprünglich in den Reaktionskanal eingebrachten Lösung der
20 lysierten Probe.
48. Verfahren nach Anspruch 37 bis 47,
 dadurch gekennzeichnet,
 daß zur Lysemischung eine zweite Pufferkomponente zugegeben wird
25 und danach eine Elektroelution stattfindet.
49. Verwendung eines Verfahrens nach Anspruch 37 bis 48 zur
 Isolierung von Desoxyribonukleinsäuren (DNA) ohne Kontamination
 durch Ribonukleinsäuren (RNA).

50. Verwendung eines Verfahrens nach Anspruch 37 bis 48 zur Isolierung von Ribonukleinsäuren (RNA) ohne Kontamination durch Desoxyribonukleinsäuren (DNA).
- 5 51. Verwendung eines Verfahrens nach Anspruch 37 bis 48 zur Durchführung von Immunoassays.

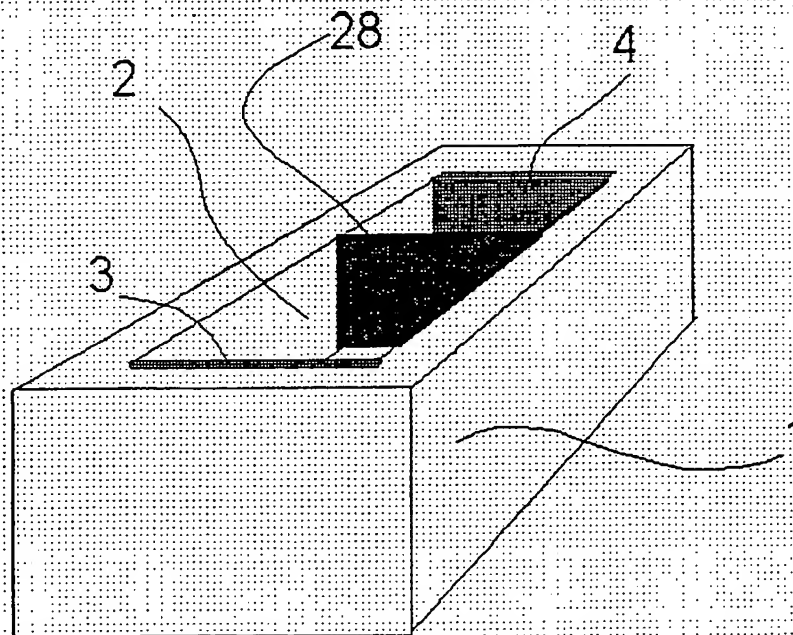


Fig. 1a

2/29

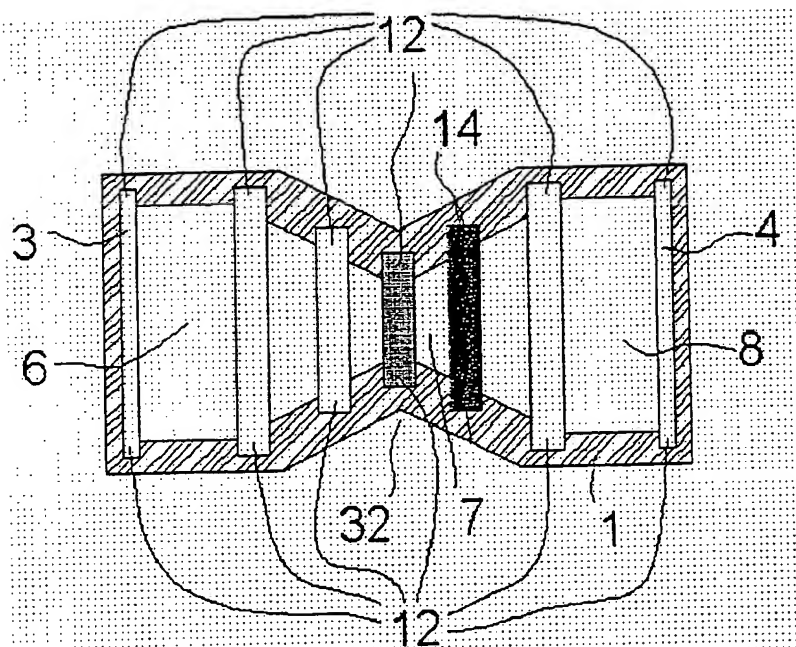


Fig. 1b

3/29

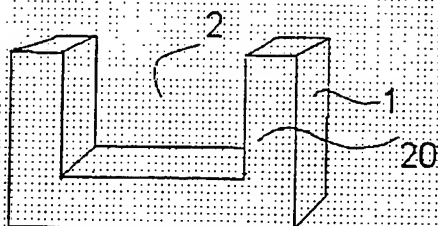


Fig. 1c

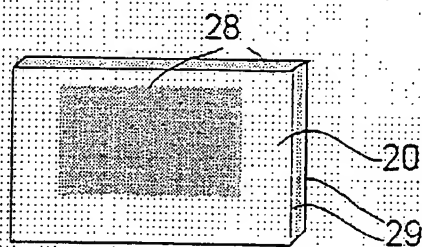


Fig. 1d

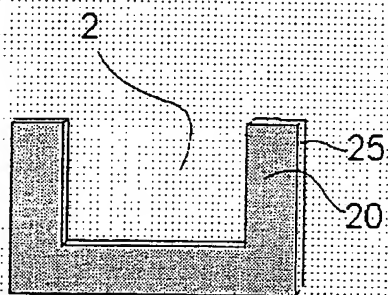


Fig. 1e

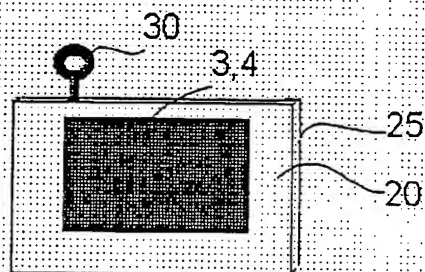


Fig. 1f

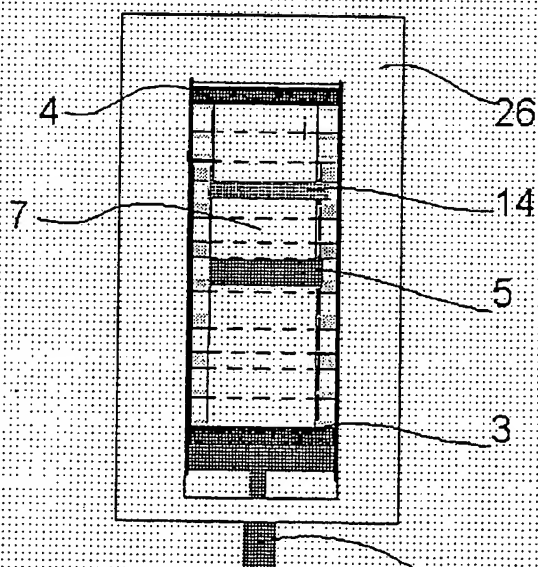


Fig. 1g

4/29

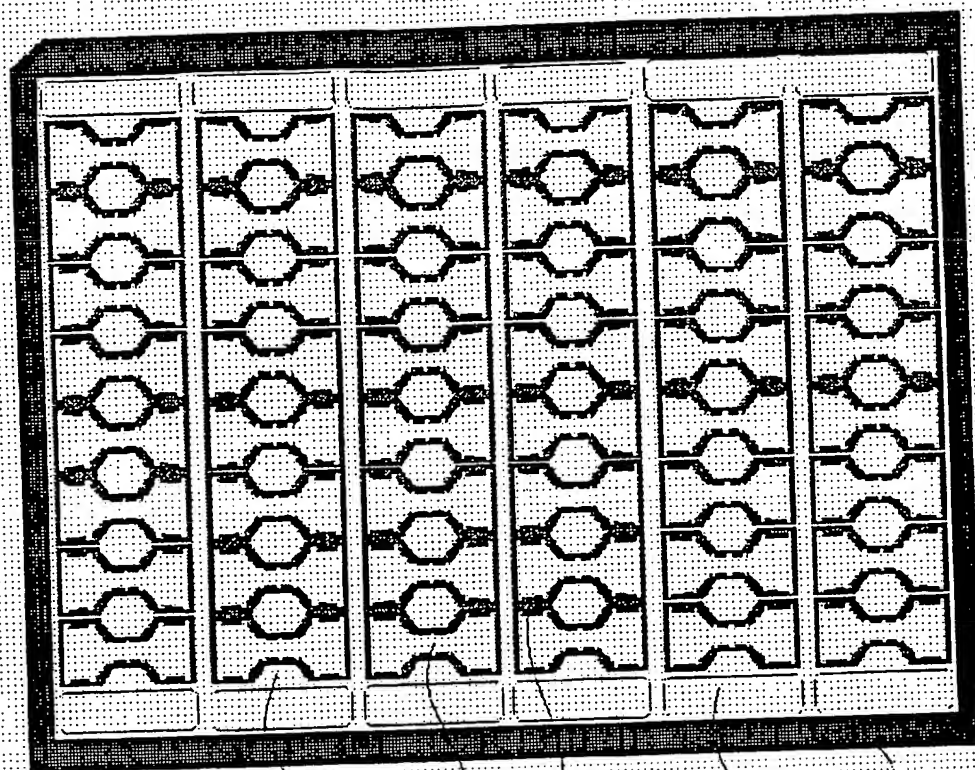


Fig. 1 h

32

2

1

19

18

5/29

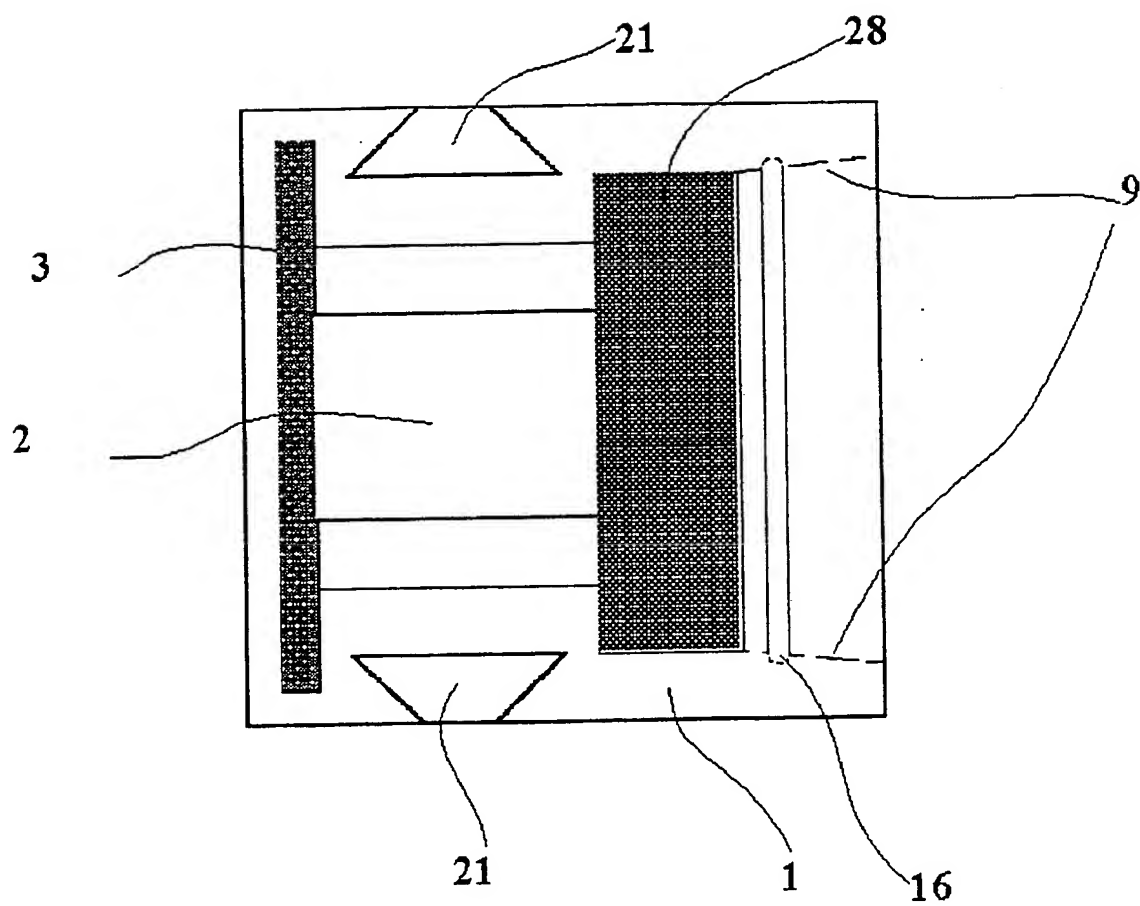
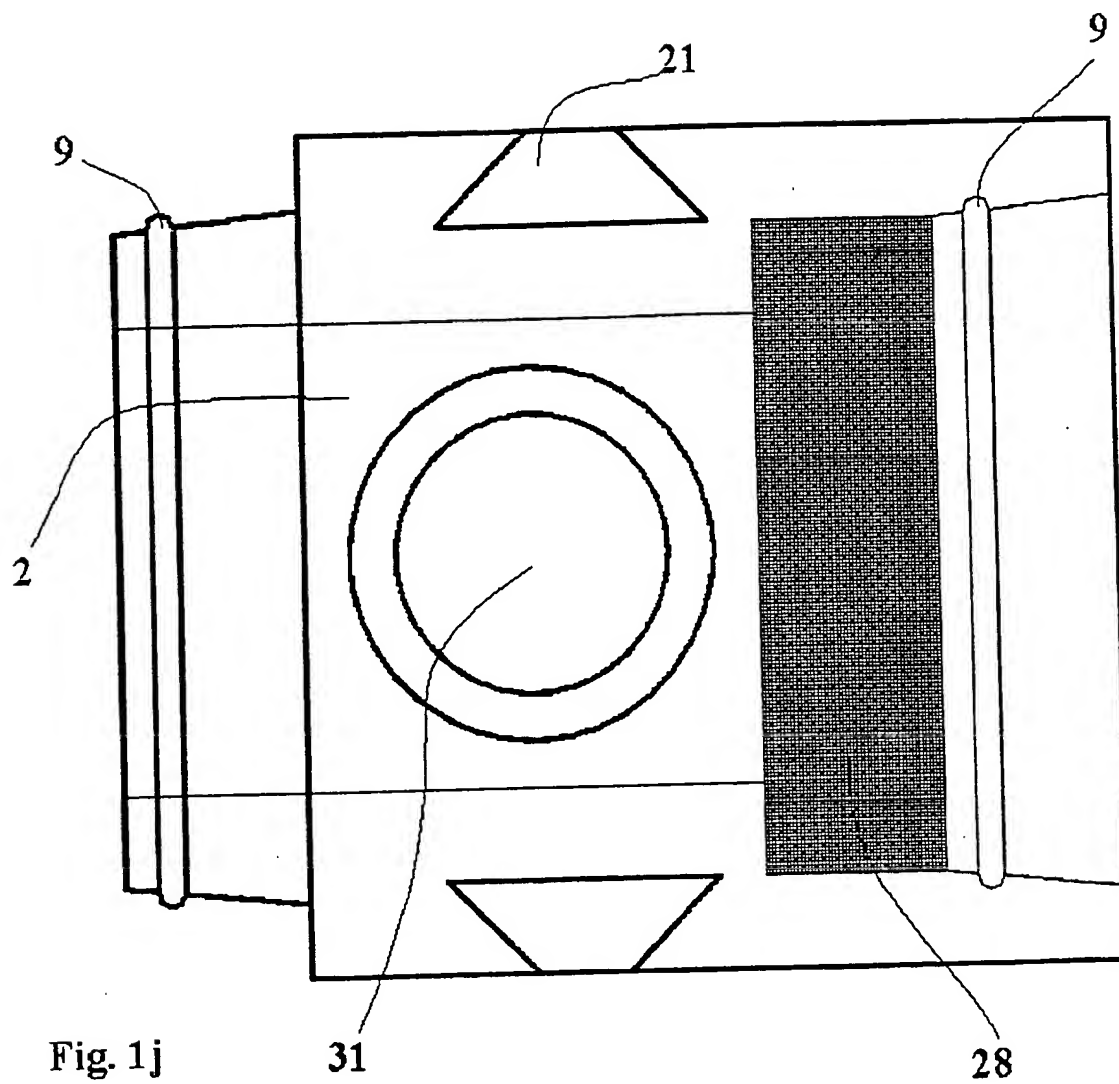


Fig. 1i

6/29



7/29

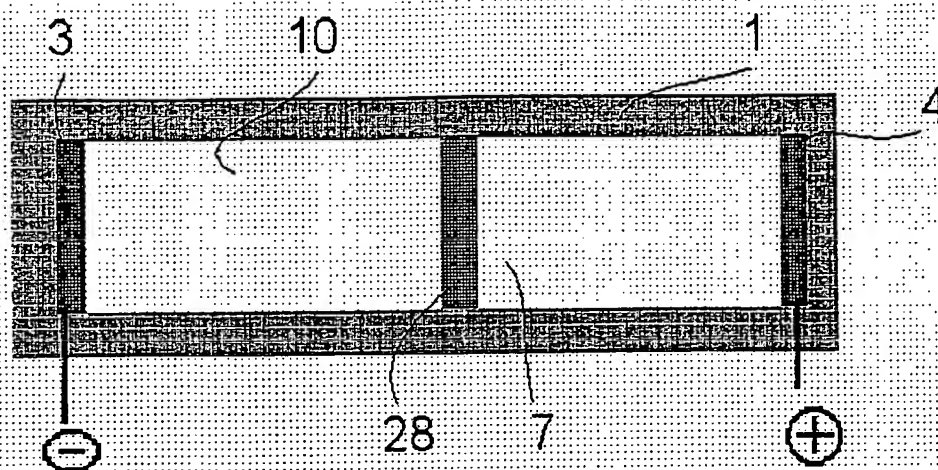


Fig. 2a

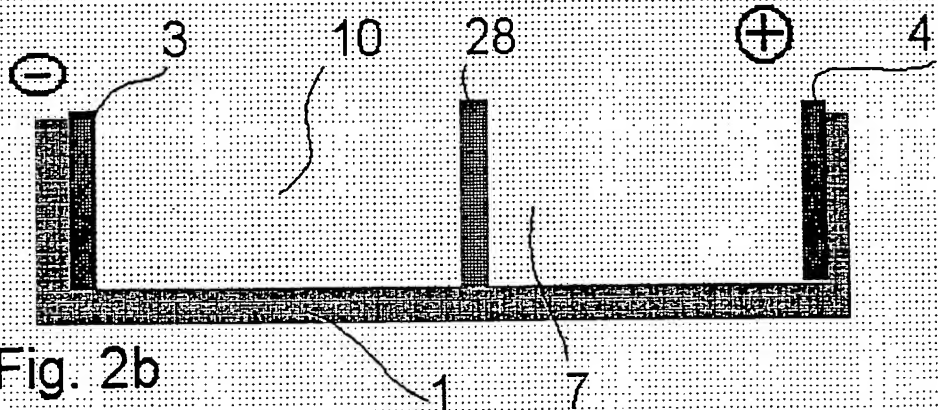


Fig. 2b

8/29

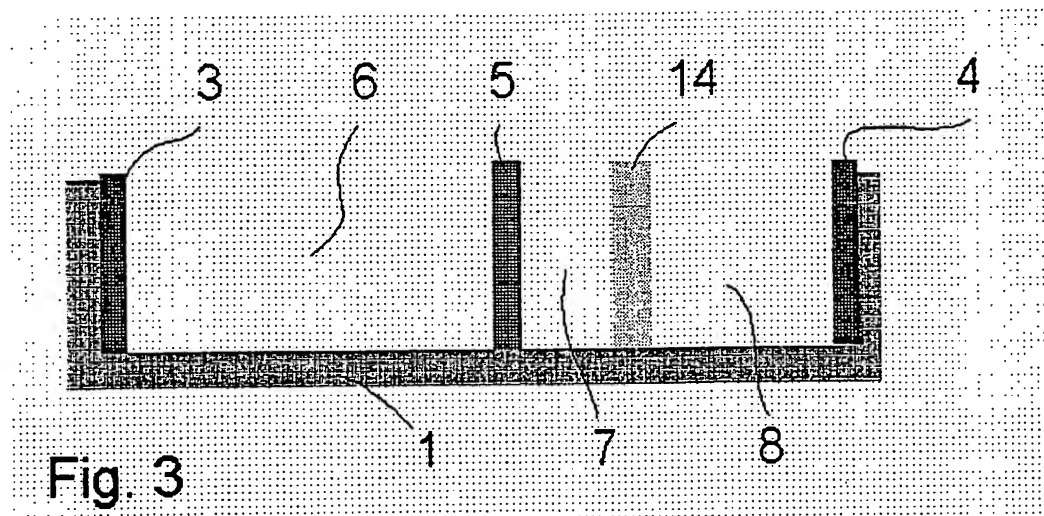


Fig. 3

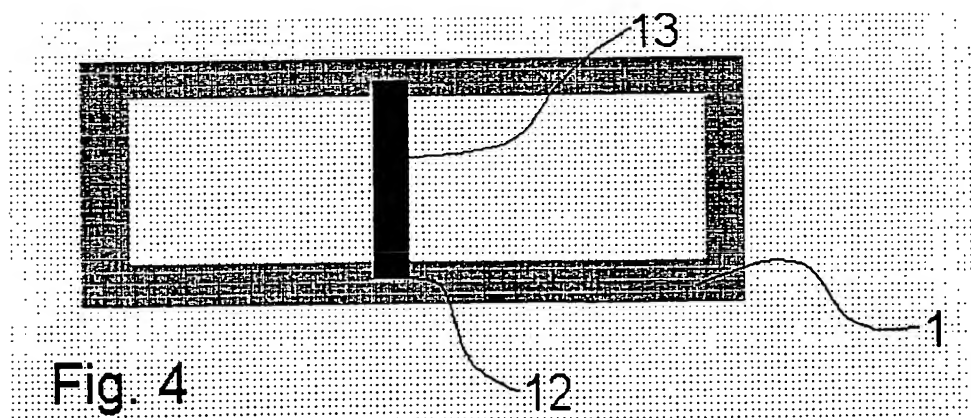


Fig. 4

9/29

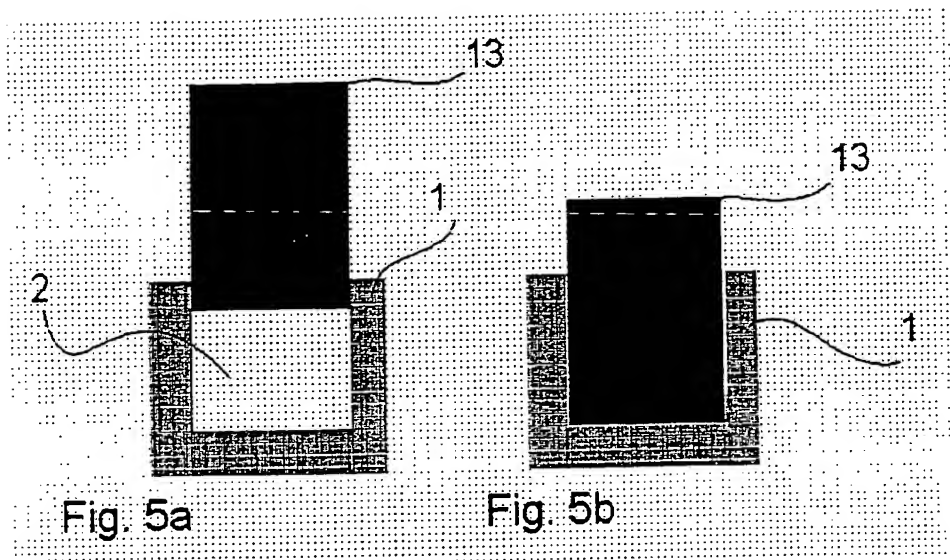


Fig. 5a

Fig. 5b

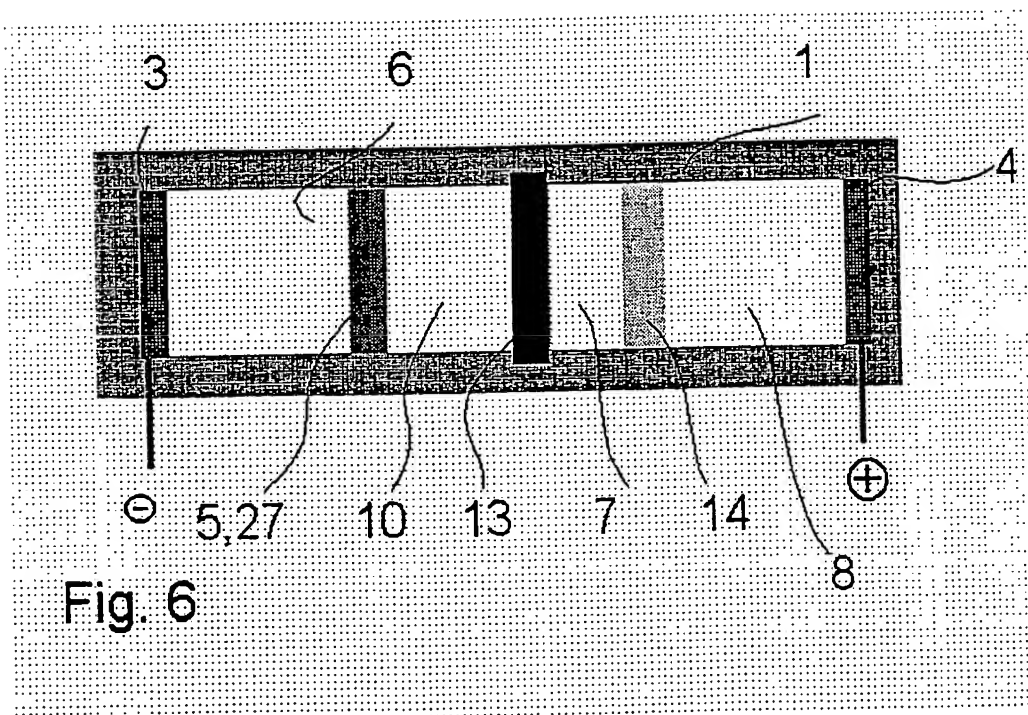
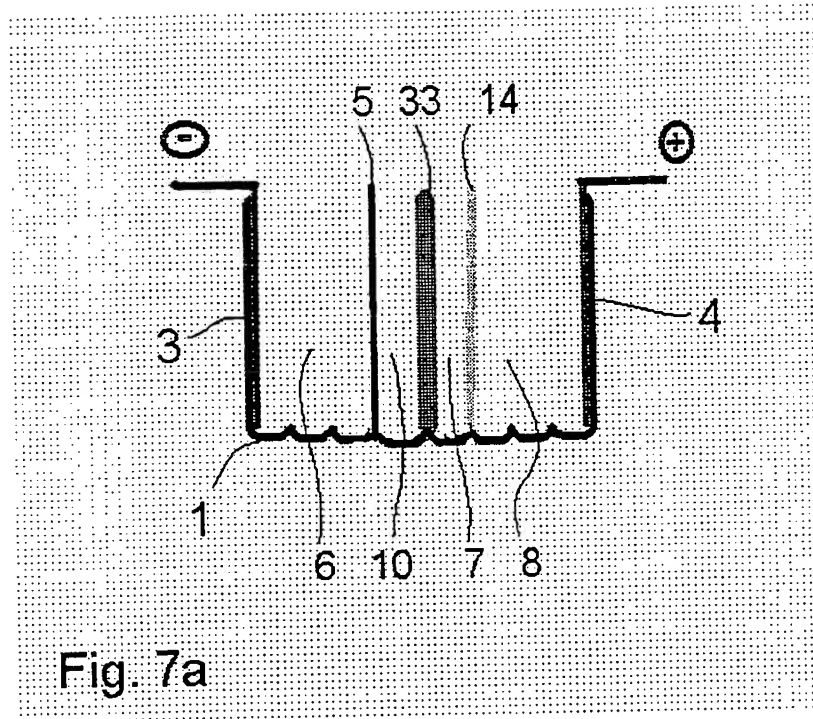


Fig. 6

10/29



11/29

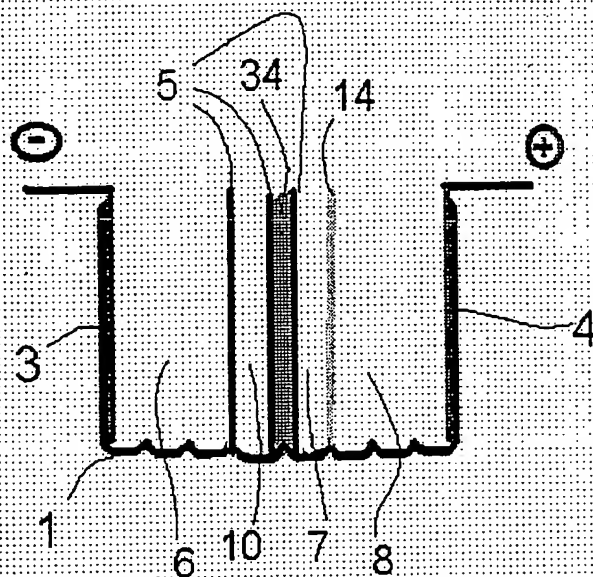


Fig. 7b

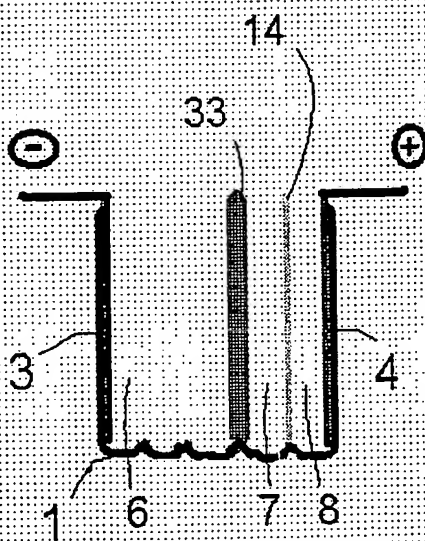
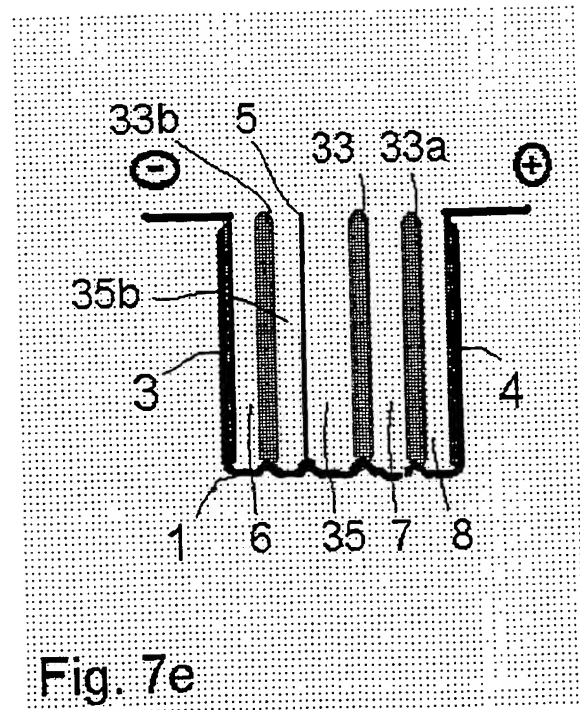
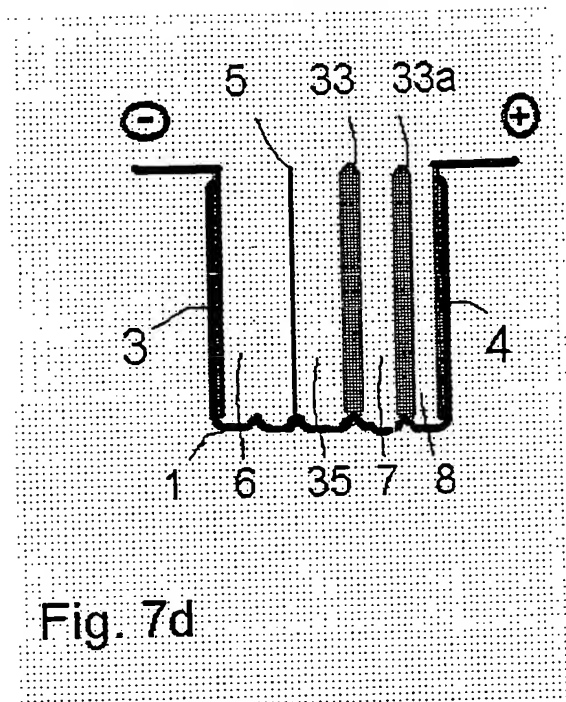
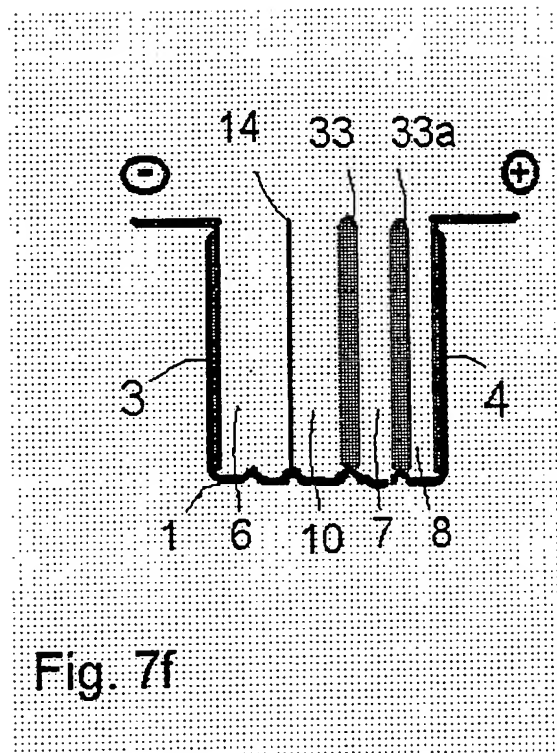


Fig. 7c

12/29



13/29



14/29

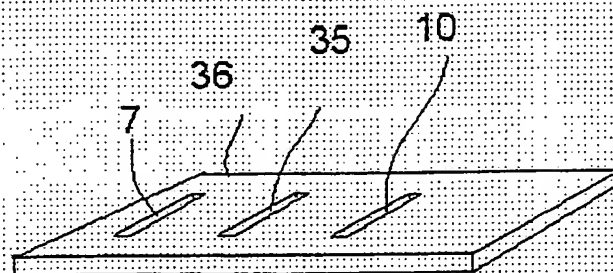


Fig. 7 g

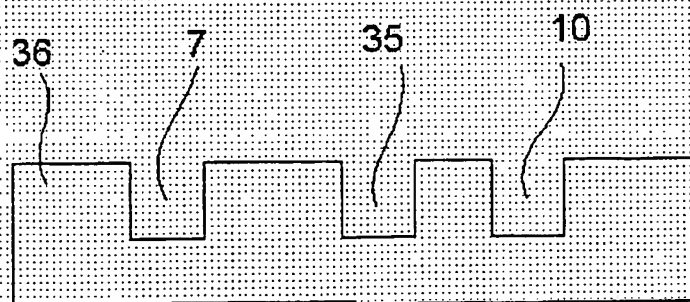


Fig. 7h

15/29

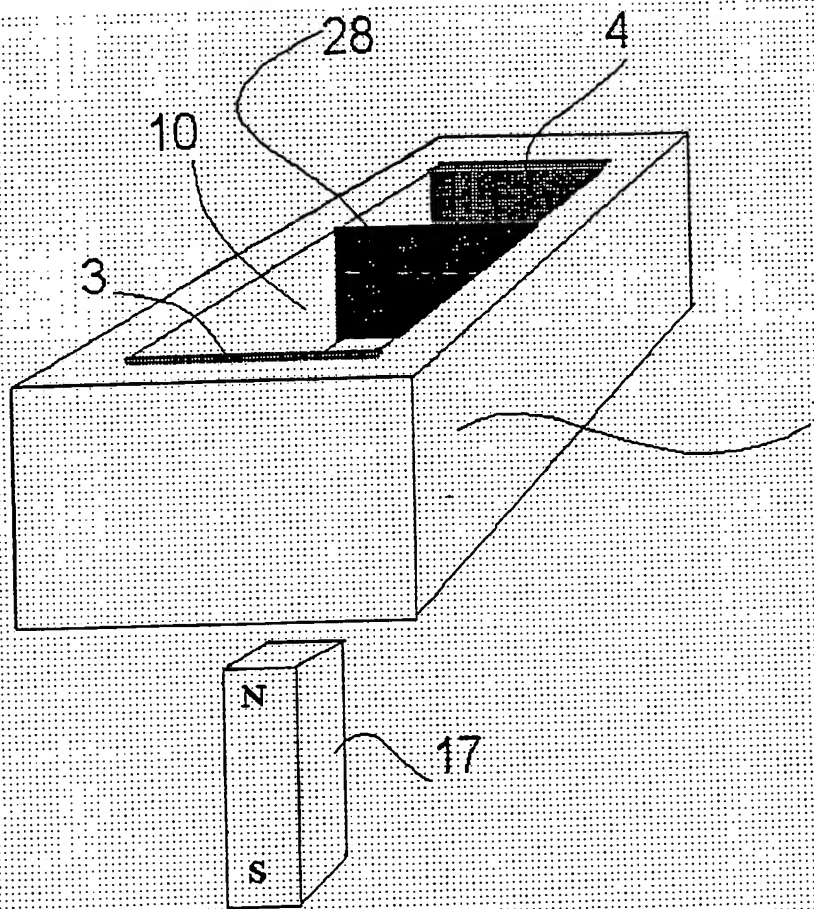


Fig. 8

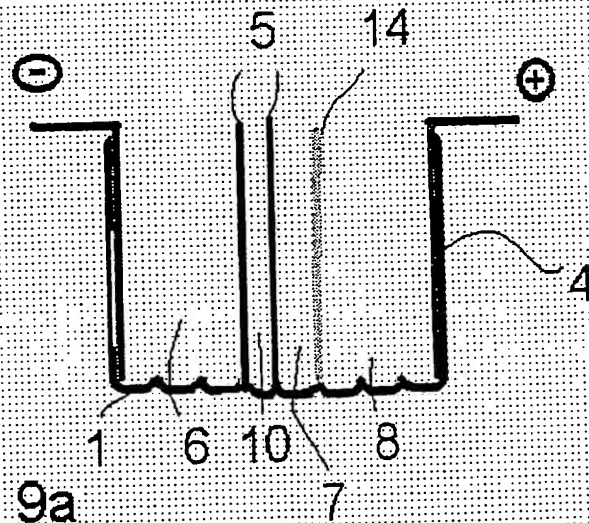


Fig. 9a

16/29

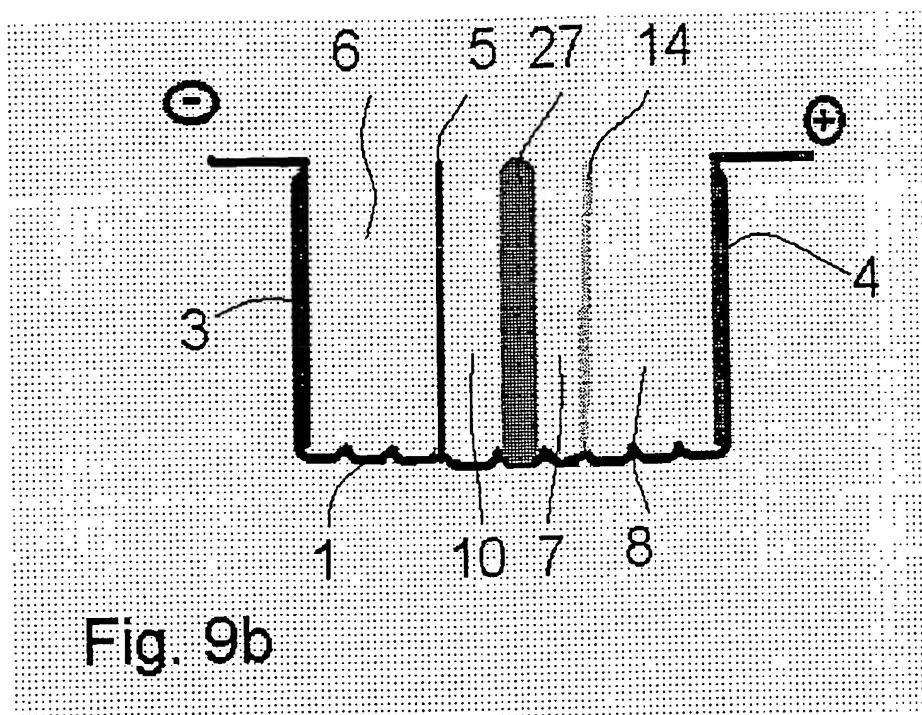


Fig. 9b

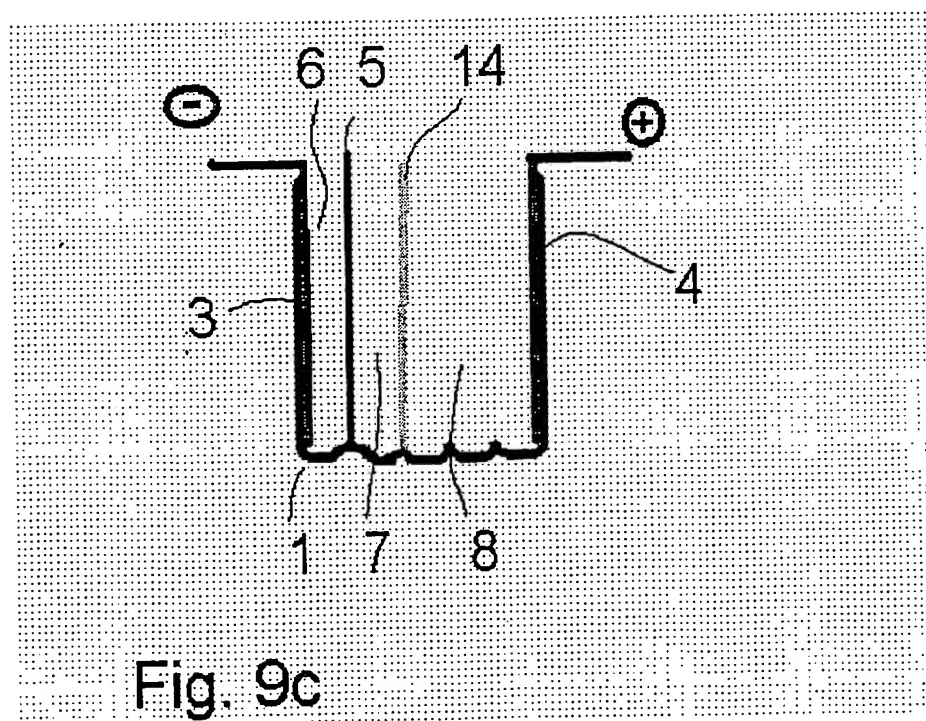


Fig. 9c

17/29



Fig. 10 a

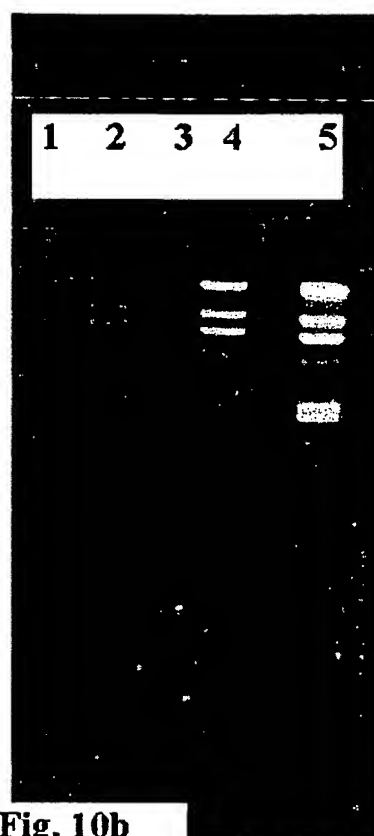
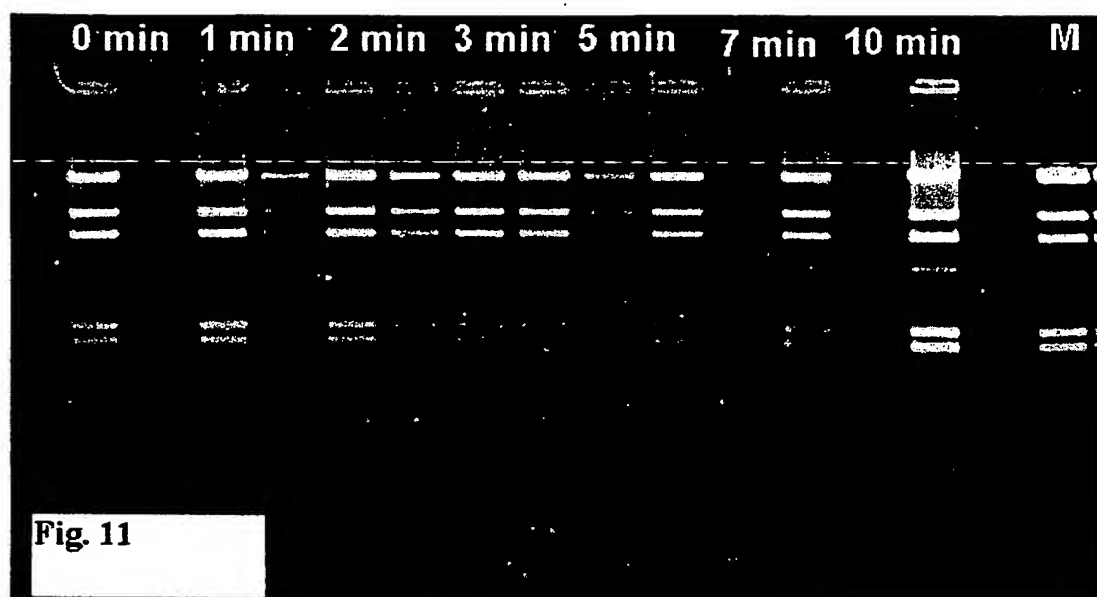


Fig. 10b

18/29



19/29

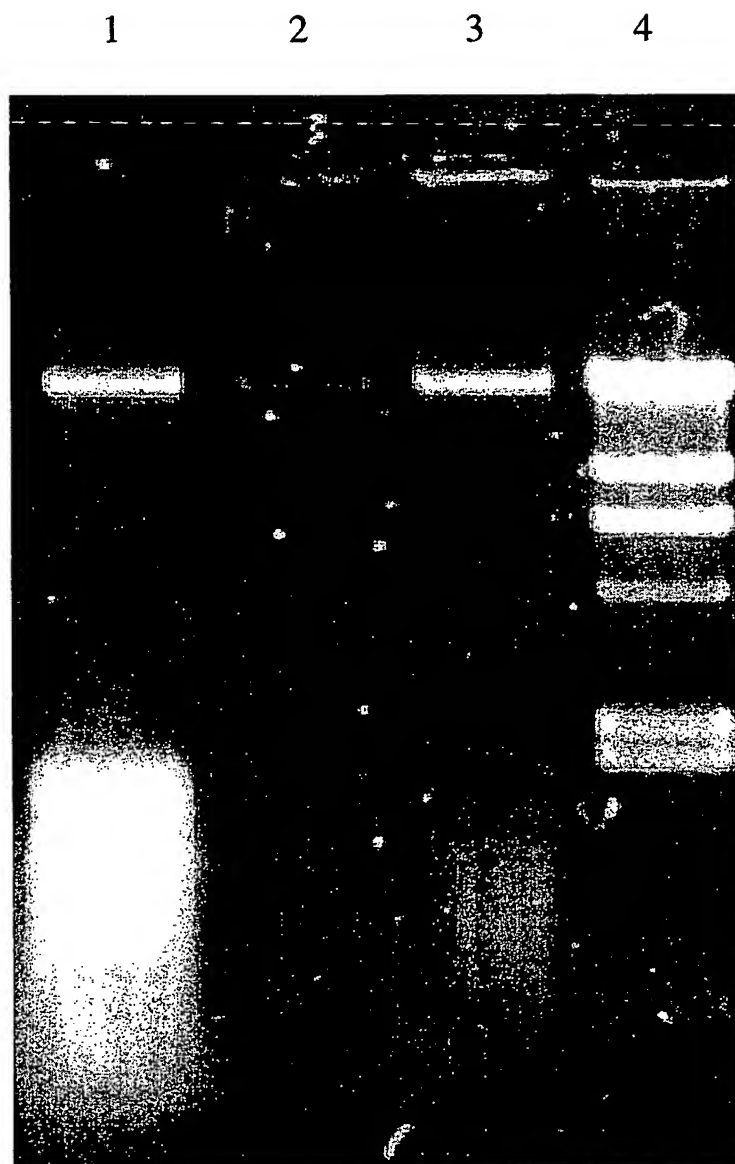


Fig. 12

20/29

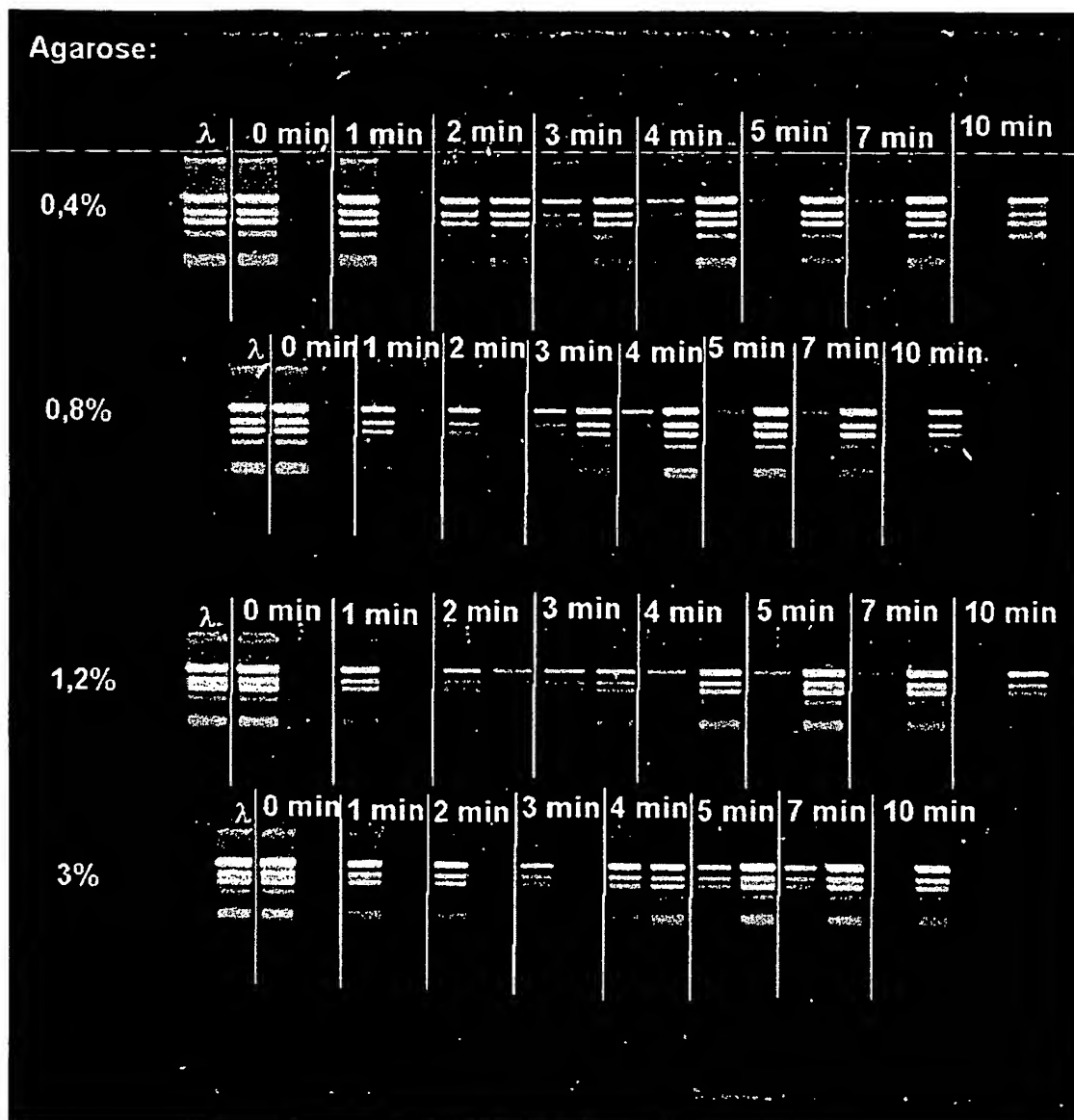


Fig. 13

21/29

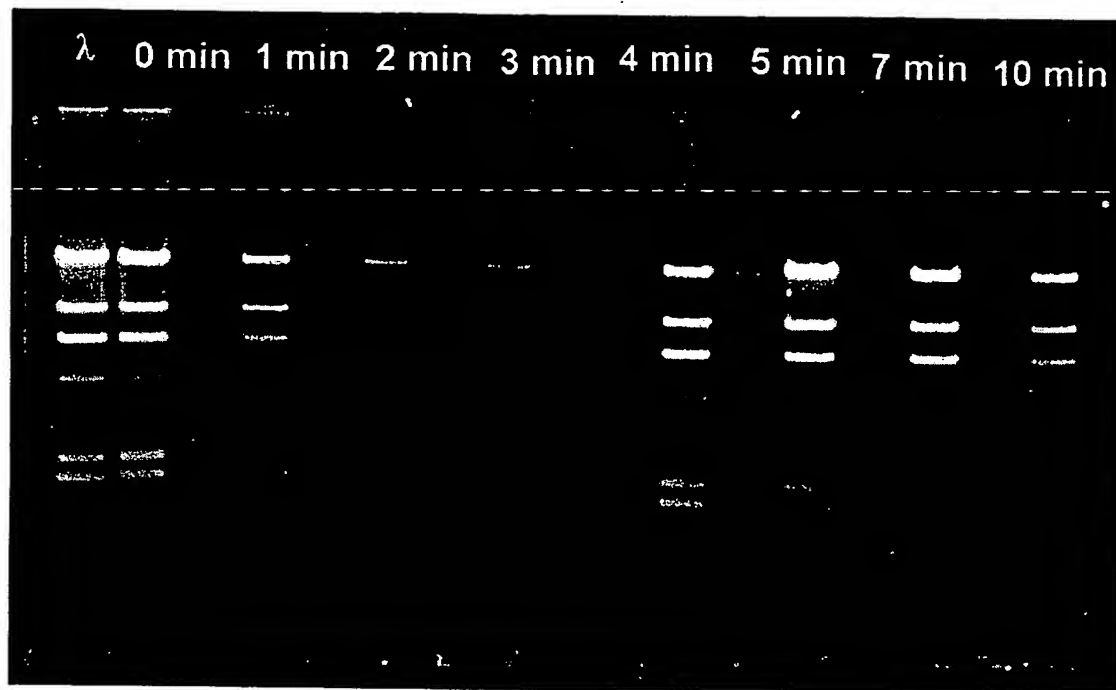


Fig. 14

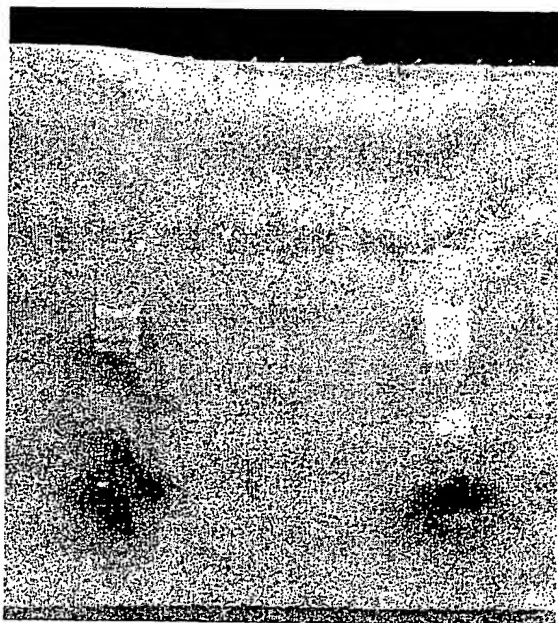


Fig. 15

22/29

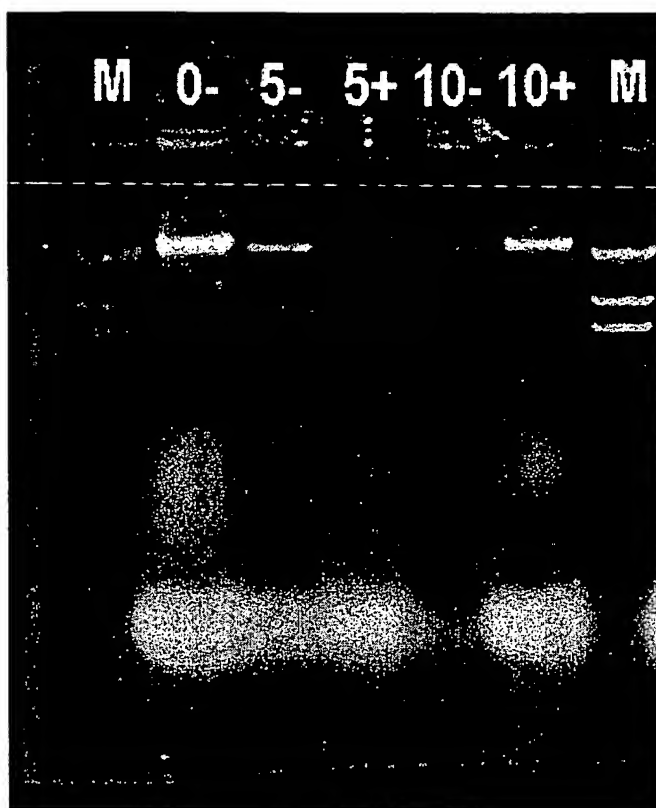


Fig. 16

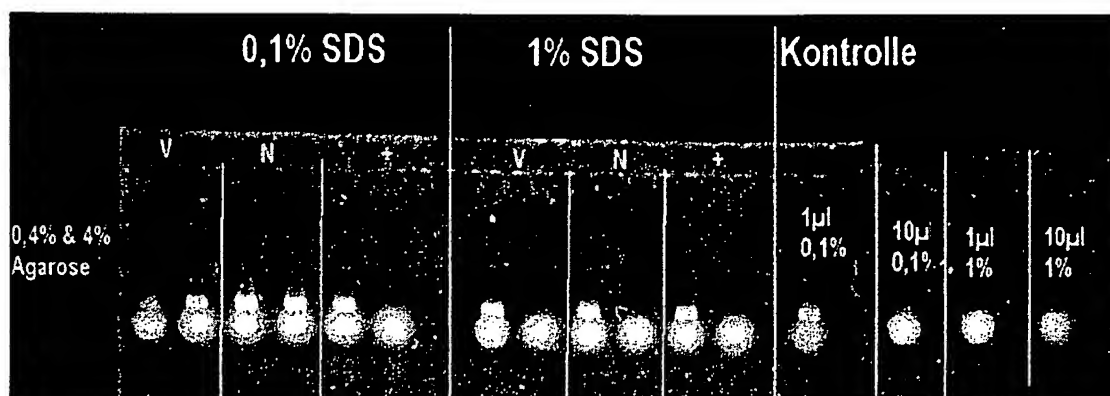


Fig. 17

23/29

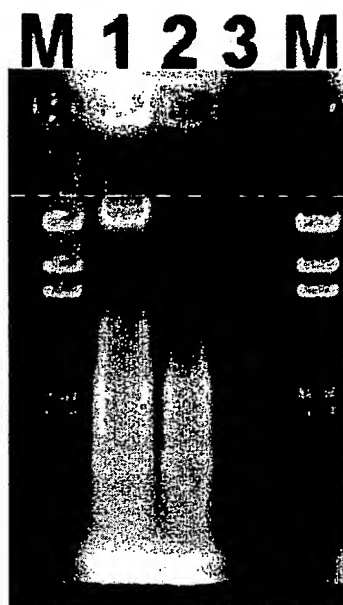


Fig. 18

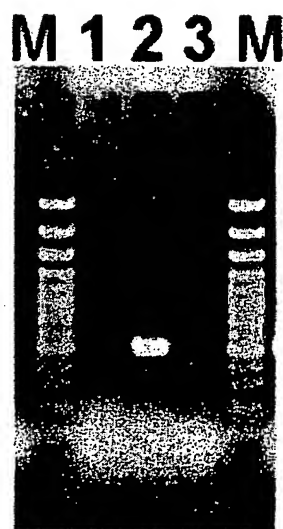


Fig. 19

24/29



Fig. 20

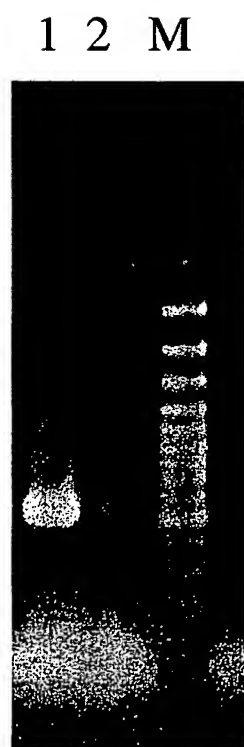


Fig. 21

25/29

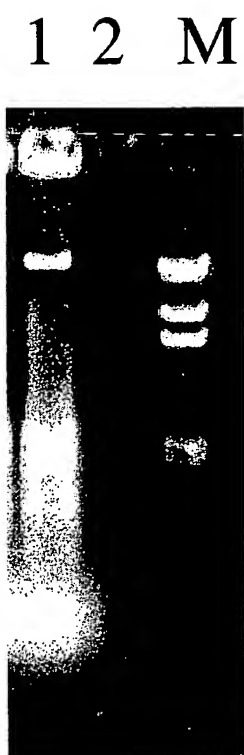


Fig. 22

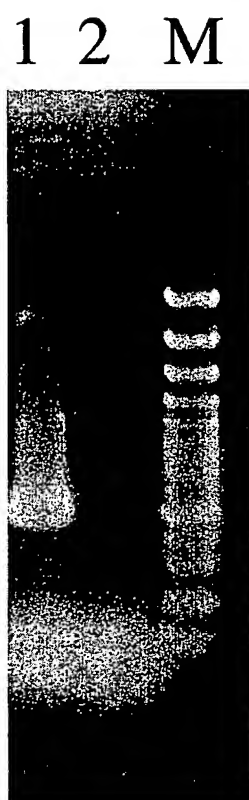


Fig. 23

26/29

t= 0 t=2 min t= 4 min t= 6 min
M 1 2 3 M 1 2 3 M 1 2 3 M 1 2 3 M

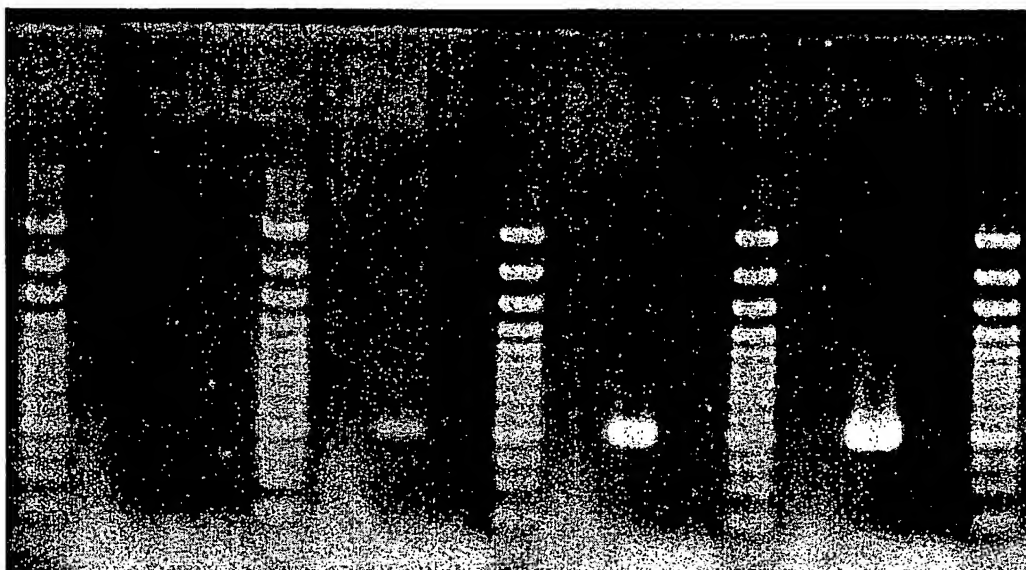
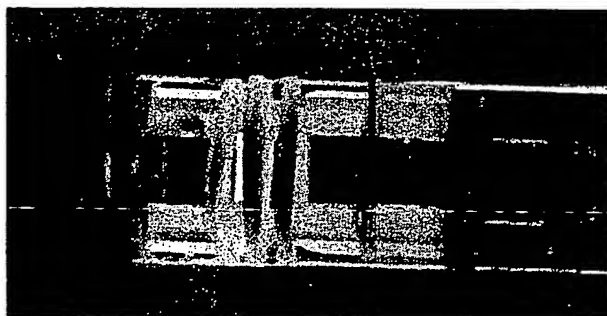


Fig. 24

27/29



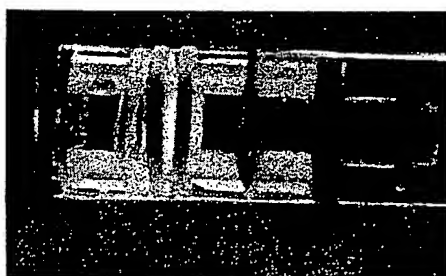
Fluoreszenzfarbstoff
0 sec



60 sec



120 sec



180 sec

Fig. 25

28/29

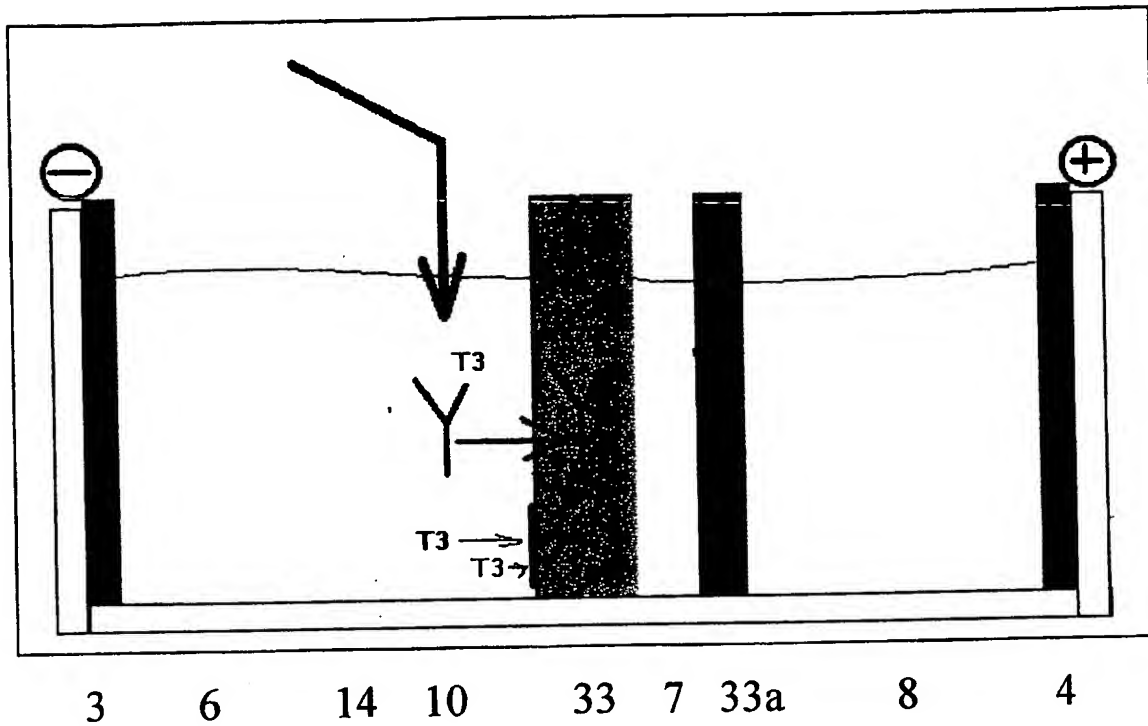


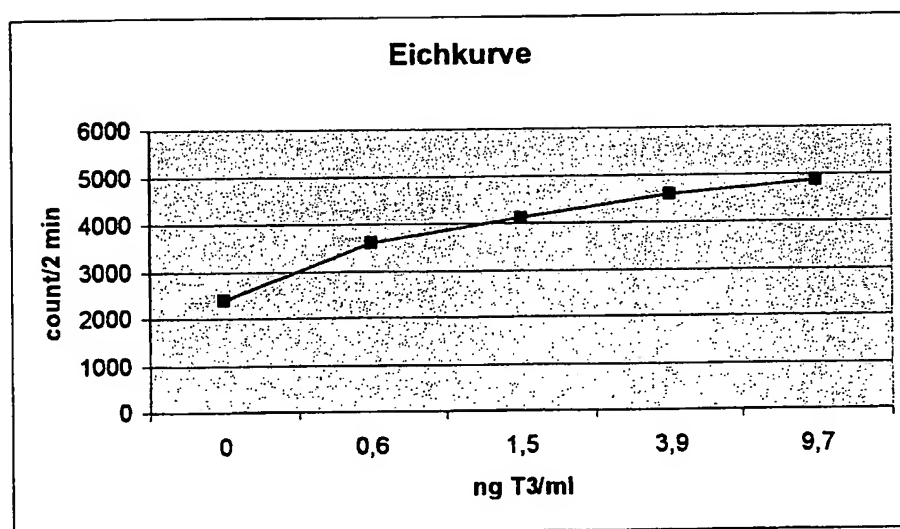
Fig. 26

29/29

Fig. 27

Ergebnisse

		NgT3/ml	Counts/2min
Standard 0	T3-freies Serum	0	2386
Standard 1	0,6 ng T3/ml	0,6	3612
Standard 2	1,5 ng T3/ml	1,5	4122
Standard 3	3,9 ng T3/ml	3,9	4601
Standard 4	9,7 ng T3/ml	9,7	4872



International Application No
PCT/EP 04560

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
------------	--	-----------------------

1, 5, 8,
18, 19,
21, 22,
34-37,
42, 49, 50
2, 3, 9,
11, 13,
15, 16, 20

-/-

☒ Patent family members are listed in annex.

"&" document member of the same patent family

Johnson, K

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No
PCT/E/04560

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y A	US 4 608 147 A (CLAD A) 26 August 1986 (1986-08-26) cited in the application column 1, line 62 -column 6, line 25 figures 1-3	2,3,11, 13,15, 16,20 7,34-37, 42,49,50
Y A	GOEBEL U ET AL: "Quantitative electroelution of oligonucleotides and large DNA fragments from gels and purification by electrodialysis" JOURNAL OF BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL METHODS, vol. 14, no. 5, 1987, pages 245-260, XP002048467 ISSN 0165-022X page 246, paragraph 3 -page 249, paragraph 2 page 259, paragraph 3 figures 1,2	9 1-3,5, 11,15, 20-22, 34-37, 49,50
X Y A	DE 197 25 190 A (INNOVA) 17 December 1998 (1998-12-17) page 3, line 17 -page 4, line 46 figures 3,7-9 & WO 98 58251 A (...) cited in the application	37,38, 40-42, 44-46,51 1-5, 7-11, 13-16, 18-22, 32-34, 39,43 47,48
Y A	US 4 204 929 A (BIER M) 27 May 1980 (1980-05-27) column 3, line 9 -column 4, line 14 column 5, line 22 -column 9, line 9 figures 1-3	1-5, 7-11, 13-16, 18-22, 32-34, 39,43 6,12,17

-/--

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

national Application No
PCT/E/04560

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y A	US 4 707 233 A (MARGOLIS J) 17 November 1987 (1987-11-17) column 3, line 28 -column 4, line 49 figures 1,3; example 1 -----	23,27,30 4,32,39 1-5,7,8, 24-26, 28,29
X Y A	EP 0 240 586 A (GREGOR H P) 14 October 1987 (1987-10-14) examples 48,56 -----	23,27-29 10 4,24-26, 32,39
X A	GB 1 359 944 A (MILES LABORATORIES) 17 July 1974 (1974-07-17) page 1, line 12 -page 3, line 113 figures 1,2,5 -----	23-25 1,2,4, 26,32, 34,37,39
X A	FR 2 614 907 A (GERIBALDI M) 10 November 1988 (1988-11-10) page 1, line 25 -page 5, line 19 figures 1-5 -----	23,27, 28,31 4,29,32, 39
P,X	DE 299 08 807 U (BILATEC) 11 November 1999 (1999-11-11) the whole document -----	1-3, 5-11, 18-22,34

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/EP/04560

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9734908	A	25-09-1997	DE 19610354 C EP 0891369 A US 6071395 A	20-11-1997 20-01-1999 06-06-2000
US 4608147	A	26-08-1986	DE 3337669 A DE 3513897 A FR 2553295 A GB 2148326 A, B JP 60098347 A	02-05-1985 30-10-1986 19-04-1985 30-05-1985 01-06-1985
DE 19725190	A	17-12-1998	WO 9858251 A EP 0988536 A	23-12-1998 29-03-2000
US 4204929	A	27-05-1980	DE 2967232 D EP 0018375 A JP 55500261 T WO 7900942 A US 4362612 A	31-10-1984 12-11-1980 01-05-1980 15-11-1979 07-12-1982
US 4707233	A	17-11-1987	GB 2177211 A, B	14-01-1987
EP 0240586	A	14-10-1987	DE 3687577 T US 4596858 A	24-06-1993 24-06-1986
GB 1359944	A	17-07-1974	AU 475968 B AU 5733873 A CA 1009181 A DE 2336414 A FR 2192875 A IL 42596 A JP 49046498 A	09-09-1976 09-01-1975 26-04-1977 31-01-1974 15-02-1974 31-03-1976 04-05-1974
FR 2614907	A	10-11-1988	NONE	
DE 29908807	U	11-11-1999	NONE	

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 GO1N27/447

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 7 GO1N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 97 34908 A (INNOVA) 25. September 1997 (1997-09-25) in der Anmeldung erwähnt	1,5,8, 18,19, 21,22, 34-37, 42,49,50
Y	Seite 2, Zeile 19 -Seite 4, Zeile 12 Seite 9, Zeile 4 -Seite 10, Zeile 2 Seite 11, Zeile 11 -Seite 13, Zeile 10 Abbildungen 7A-7F,8,11,13 — -/-	2,3,9, 11,13, 15,16,20



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"Z" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

23. August 2000

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

01/09/2000

Name und Postanschrift der internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Johnson, K

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y A	US 4 608 147 A (CLAD A) 26. August 1986 (1986-08-26) in der Anmeldung erwähnt Spalte 1, Zeile 62 -Spalte 6, Zeile 25 Abbildungen 1-3	2,3,11, 13,15, 16,20 7,34-37, 42,49,50
Y A	GOEBEL U ET AL: "Quantitative electroelution of oligonucleotides and large DNA fragments from gels and purification by electrodialysis" JOURNAL OF BIOCHEMICAL AND BIOPHYSICAL METHODS, Bd. 14, Nr. 5, 1987, Seiten 245-260, XP002048467 ISSN 0165-022X Seite 246, Absatz 3 -Seite 249, Absatz 2 Seite 259, Absatz 3 Abbildungen 1,2	9 1-3,5, 11,15, 20-22, 34-37, 49,50
X Y A	DE 197 25 190 A (INNOVA) 17. Dezember 1998 (1998-12-17) Seite 3, Zeile 17 -Seite 4, Zeile 46 Abbildungen 3,7-9 & WO 98 58251 A (...) in der Anmeldung erwähnt	37,38, 40-42, 44-46,51 1-5, 7-11, 13-16, 18-22, 32-34, 39,43 47,48
Y A	US 4 204 929 A (BIER M) 27. Mai 1980 (1980-05-27) Spalte 3, Zeile 9 -Spalte 4, Zeile 14 Spalte 5, Zeile 22 -Spalte 9, Zeile 9 Abbildungen 1-3	1-5, 7-11, 13-16, 18-22, 32-34, 39,43 6,12,17

-/-

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X Y A	US 4 707 233 A (MARGOLIS J) 17. November 1987 (1987-11-17) Spalte 3, Zeile 28 -Spalte 4, Zeile 49 Abbildungen 1,3; Beispiel 1 -----	23,27,30 4,32,39 1-5,7,8, 24-26, 28,29
X Y A	EP 0 240 586 A (GREGOR H P) 14. Oktober 1987 (1987-10-14) Beispiele 48,56 -----	23,27-29 10 4,24-26, 32,39
X A	GB 1 359 944 A (MILES LABORATORIES) 17. Juli 1974 (1974-07-17) Seite 1, Zeile 12 -Seite 3, Zeile 113 Abbildungen 1,2,5 -----	23-25 1,2,4, 26,32, 34,37,39
X A	FR 2 614 907 A (GERIBALDI M) 10. November 1988 (1988-11-10) Seite 1, Zeile 25 -Seite 5, Zeile 19 Abbildungen 1-5 -----	23,27, 28,31 4,29,32, 39
P,X	DE 299 08 807 U (BILATEC) 11. November 1999 (1999-11-11) das ganze Dokument -----	1-3, 5-11, 18-22,34

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/E/04560

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9734908 A	25-09-1997	DE 19610354 C EP 0891369 A US 6071395 A	20-11-1997 20-01-1999 06-06-2000
US 4608147 A	26-08-1986	DE 3337669 A DE 3513897 A FR 2553295 A GB 2148326 A, B JP 60098347 A	02-05-1985 30-10-1986 19-04-1985 30-05-1985 01-06-1985
DE 19725190 A	17-12-1998	WO 9858251 A EP 0988536 A	23-12-1998 29-03-2000
US 4204929 A	27-05-1980	DE 2967232 D EP 0018375 A JP 55500261 T WO 7900942 A US 4362612 A	31-10-1984 12-11-1980 01-05-1980 15-11-1979 07-12-1982
US 4707233 A	17-11-1987	GB 2177211 A, B	14-01-1987
EP 0240586 A	14-10-1987	DE 3687577 T US 4596858 A	24-06-1993 24-06-1986
GB 1359944 A	17-07-1974	AU 475968 B AU 5733873 A CA 1009181 A DE 2336414 A FR 2192875 A IL 42596 A JP 49046498 A	09-09-1976 09-01-1975 26-04-1977 31-01-1974 15-02-1974 31-03-1976 04-05-1974
FR 2614907 A	10-11-1988	KEINE	
DE 29908807 U	11-11-1999	KEINE	

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.